



UNIVERSIDAD ANDINA SIMÓN BOLÍVAR

SEDE CENTRAL

Sucre-Bolivia

**PROGRAMA INTERNACIONAL DE MAESTRÍA EN
“SALUD PÚBLICA – VI VERSIÓN”**

**“EVALUACIÓN DE LA EFICACIA DE LAS PRUEBAS
INMUNOCROMATOGRÁFICAS (STAT-PAK™ E INBIOS™) APLICADAS EN
PARALELO, RESPECTO AL PROTOCOLO CONVENCIONAL (HAI – ELISA)
PARA EL DIAGNÓSTICO DE CHAGAS.
LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE REFERENCIA DE CHUQUISACA,
MARZO A MAYO DE 2014”**

**Tesis presentada para obtener el Grado
Académico de Magister en “Salud Pública”**

MAESTRANTE: KARINA ESTHER EGÜEZ SOLIZ

SUCRE - BOLIVIA

2014



UNIVERSIDAD ANDINA SIMÓN BOLÍVAR

SEDE CENTRAL

Sucre-Bolivia

**PROGRAMA INTERNACIONAL DE MAESTRÍA EN
“SALUD PÚBLICA – VI VERSIÓN”**

**“EVALUACIÓN DE LA EFICACIA DE LAS PRUEBAS
INMUNOCROMATOGRÁFICAS (STAT-PAK™ E INBIOS™) APLICADAS EN
PARALELO, RESPECTO AL PROTOCOLO CONVENCIONAL (HAI – ELISA)
PARA EL DIAGNÓSTICO DE CHAGAS.**

**LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE REFERENCIA DE CHUQUISACA,
MARZO A MAYO DE 2014”**

**Tesis presentada para obtener el Grado
Académico de Magister en “Salud Pública”**

MAESTRANTE: KARINA ESTHER EGÜEZ SOLIZ

TUTOR: Dr. GRÓVER LINARES PADILLA

SUCRE - BOLIVIA

2014

DEDICATORIA

*A mi querido hijo Gabriel, el mayor de mis
logros,....mi fortaleza, la luz de mi
camino.....*

A mis padres, el apoyo permanente en mi vida.

AGRADECIMIENTOS

Al CEADES, Salud y Medio Ambiente, por todo el apoyo recibido en la Plataforma de Sucre.

A la Dra. María Jesús Pinazo de la Fundación Clinic de Barcelona-CRESIB, por su impulso incondicional.

Al Programa de Enfermedades de Transmisión Vectorial del SEDES Chuquisaca.

A mi equipo de trabajo en el Laboratorio Departamental de Referencia, por el esfuerzo y dedicación para el éxito de la investigación.

RESUMEN

El presente estudio de investigación tiene como objetivo general “evaluar la eficacia de las pruebas inmunocromatográficas (Stat-Pak™ e InBios™) aplicadas en paralelo, respecto al protocolo convencional (HAI – ELISA) para el diagnóstico de Chagas”.

El enfoque del estudio es **cuantitativo** y se constituye en una **valoración de pruebas diagnósticas** de **corte transversal, descriptivo y analítico**, realizado a doble ciego.

Participaron 342 pacientes de 1 a <60 años de edad que acudieron con solicitud de diagnóstico de Chagas al Laboratorio de Referencia de Chagas y a la Plataforma de atención integral de Chagas.

El análisis comparativo de la *sensibilidad, especificidad y valores predictivos* de la dupla inmunocromatográfica propuesta (Stat-Pak e InBIOS) frente a la prueba estándar de referencia (ELISA Recombinante) utilizando sangre total en el ensayo, fue del **100%** (IC: 99,76 - 100%), **99.25%** (IC: 98,87 - 99,64%), **99.52%** (IC: 99,28 - 99,77%) y **100%** (IC: 99,62 - 100%.) respectivamente, lo que significa que con la dupla propuesta es posible detectar correctamente a todos los positivos y clasificar como negativos a los individuos que realmente no presentan la enfermedad.

La conclusión diagnóstica de la dupla inmunocromatográfica en relación a la prueba estándar de referencia mostró una excelente *concordancia* (99.7% acuerdo global), con una estadística kappa de excelencia ($k = 0.9939$). El grado de concordancia de InBios con respecto a Stat-Pak, fue perfecto ($k = 1.0$) y frente a la prueba de referencia fue óptimo (0.99). La concordancia del Stat-Pak frente a la prueba de referencia fue excelente ($k = 0.99$).

La *eficiencia o valor predictivo global* de la dupla inmunocromatográfica (Stat-Pak/InBios), y de la dupla convencionalmente usada (HAI/ELISA), es la misma, es decir, que el 99.71% de los individuos fueron clasificados correctamente por ambas opciones diagnósticas.

Los resultados obtenidos en esta investigación son bastante alentadores para considerar la utilización de esta dupla inmunocromatográfica que al desarrollarse en paralelo, utilizando sangre entera como muestra por punción digital, pueda concluir el diagnóstico en pocos minutos y ser utilizada como una alternativa de diagnóstico confiable, eficaz y eficiente en terreno, que pueda ser incluida dentro de los protocolos nacionales de diagnóstico, como alternativa diagnóstica de primera línea en los lugares endémicos y no-endémicos de difícil o carentes de acceso geográfico a laboratorios de 2º nivel, logrando así, un inicio de tratamiento en el momento, previa orientación y consejería, aumentando la adherencia al mismo.

ABSTRACT

This research study general objective is to "evaluate the efficacy of the immunochromatographic tests (Stat-Pak™ and InBios™) applied parallel to the conventional protocol (HAI - ELISA) for the diagnosis of Chagas disease".

The focus of the study is quantitative and constitutes an evaluation of diagnostic carried out analytical, descriptive and cross sectional study double-blind tests.

In it, participated 342 patients from 1 to < 60 years of age who came with application for diagnosis of Chagas disease to Reference Laboratory of Chagas and the Platform of comprehensive care of Chagas for diagnosis of Chagas disease.

The comparative analysis of the sensitivity, specificity and predictive values of the immunochromatographic couple proposed (Stat-Pak and InBIOS) against the standard reference test (ELISA recombinant) using whole blood in the trial, was 100% (IC: 99,76-100%), 99.25% (CI: 98,87 - I 99,64%,), 99.52% (CI: 99,28 - 99,77%) and 100% (IC: 99,62-100%.) respectively, which means that with the proposed pair it is possible to correctly detect all positives and classify as negative individuals that really do not they have the disease.

The conclusion of the couple immunochromatographic assay in relation to the reference standard test showed an excellent concordance (99.7% global agreement), with a statistical excellence kappa ($k = 0.9939$). The degree of concordance of InBios regarding Stat-Pak, was perfect ($k = 1.0$) and opposite the reference test was optimal (0.99). The concordance of the Stat-Pak front reference test was excellent ($k = 0.99$).

Efficiency or overall predictive value of the couple immunochromatographic (Stat-Pak/InBios), and the conventionally used couple (HAI/ELISA), is the same, namely that the 99.71% of individuals were classified correctly by both diagnostic options.

The results obtained in this research are quite encouraging to consider using this couple immunochromatographic assay, that is developing in parallel, using whole blood as shown by finger stick, can conclude the diagnosis in a few minutes and be used as an alternative for reliable, effective and efficient diagnosis in field, which can be included within the national diagnostic protocols, as an alternative diagnostic of first line where endemic and non-endemic difficult or lacking in geographical access to second level laboratories, thus giving a start of treatment at the time, prior guidance and counseling, increasing the adherence.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
CAPÍTULO I	
INTRODUCCIÓN	1
I.1 ANTECEDENTES	2
I.2 PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN	5
I.2.1 Planteamiento del Problema	5
I.2.2 Formulación del Problema	9
I.2.3 Justificación	9
I.3 OBJETIVOS	12
I.3.1 Objetivo General	12
I.3.2 Objetivos Específicos	12
I.4 HIPÓTESIS	13
 CAPÍTULO II	
MARCO TEÓRICO	14
II.1 MARCO TEÓRICO CONCEPTUAL	15
II.1.2 La Enfermedad de Chagas y la evolución en su control	18
II.1.3 El Parásito	19
II.1.4 El Vector	20
II.1.5 Mecanismos de Transmisión a Seres Humanos	21
II.1.6 Patología	21
II.1.7 Diagnóstico	22
• Hemaglutinación Indirecta (HAI) para Chagas.	23
• Ensayo Inmunoenzimático o ELISA	24
II.1.8 Validez aceptable de un método diagnóstico	24
II.1.9 Epidemiología	25
II.1.10 Métodos de Prevención y Control	26
II.2 MARCO CONTEXTUAL	27
 CAPÍTULO III	
MARCO METODOLÓGICO	29
III.1 ENFOQUE DE INVESTIGACIÓN	30
III.2 TIPO Y DISEÑO DE INVESTIGACIÓN	30
III.3 POBLACIÓN Y MUESTRA	30
III.3.1 Población o Universo	30
III.3.2 Muestra	31
• Tamaño de la muestra	31
III.4 VARIABLES DEL ESTUDIO	31
III.4.1 Identificación de Variables	31
III.4.2 Diagrama de Variables	32
III.4.3 Operacionalización de Variables	33

III.5	CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN	35
	III.5.1 Inclusión	35
	III.5.2 Exclusión	35
III.6	PROCEDIMIENTOS PARA LA RECOLECCIÓN DE LA INFORMACIÓN	35
	III.6.1 Fuente de recolección	35
	III.6.2 Procedimiento Técnico para el Diagnóstico de la Enfermedad de Chagas	35
	III.6.3 Instrumento	37
III.7	PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS DE LOS DATOS	38
III.8	DELIMITACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN	41
	III.8.1 Delimitación Geográfica	41
	III.8.2 Sujetos participantes del estudio	41
	III.8.3 Delimitación Temporal	42
	III.8.4 Alcances y Limitaciones	42
	III.8.5 Cuestiones éticas	43
	III.8.6 Cuestiones adicionales	44
	<ul style="list-style-type: none"> • Seguimiento y tratamiento de las personas que han dado positivo a la enfermedad de Chagas • Recursos Humanos e instituciones implicadas 	44

CAPÍTULO IV

	RESULTADOS	45
IV.1	RESULTADOS	46
IV.2	DISCUSIÓN	68

CAPÍTULO V

	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	77
V.1	CONCLUSIONES	78
V.2	RECOMENDACIONES	80

	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81
--	-----------------------------------	----

ANEXOS

Anexo 1	Cronograma de Actividades
Anexo 2	Registro de Datos Comparativos
Anexo 3	Evaluación Metodológica Bioquímica
Anexo 4	Coeficiente Kappa
Anexo 5	Ejemplo de Tabla de Contingencia
Anexo 6	Información Chagas Stat-Pak
Anexo 7	Información InBios
Anexo 8	Procedimientos de Diagnóstico
Anexo 9	Consentimiento Informado

ÍNDICE DE TABLAS

		Pág.
PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS DE LOS DATOS		
Tabla 1	Dupla diagnóstica inmunocromatográfica Chagas (Stat-Pak™ e InBios™) en relación a un estándar de referencia	38
Tabla 2	Dupla Stat-Pak™ e InBIOS™ en relación a la metodología convencional	39
Tabla 3	Dupla convencional HAI y ELISA en relación al estándar de referencia	40
Tabla 4	Criterios de Interpretación de Landis y Koch	40
RESULTADOS DE LA INVESTIGACIÓN		
Tabla 1	Distribución de la población del estudio de acuerdo a sexo y resultado para Chagas	46
Tabla 2	Distribución de la población de estudio de acuerdo a grupos de edad	47
Tabla 3	Cálculo de sensibilidad, especificidad y valores predictivos de la dupla inmunocromatográfica (Stat-Pak/InBios) vs. Elisa Recombinante	50
Tabla 4	Cálculo de sensibilidad, especificidad y valores predictivos de la dupla convencional (HAI/ELISA) vs. ELISA Recombinante	51
Tabla 5	Cálculo de sensibilidad, especificidad y valores predictivos de la prueba inmunocromatográfica Stat-Pak vs. ELISA Recombinante	52
Tabla 6	Cálculo de sensibilidad, especificidad y valores predictivos de la prueba inmunocromatográfica InBios vs. ELISA Recombinante	54
Tabla 7	Cálculo de sensibilidad, especificidad y valores predictivos de la prueba HAI vs. ELISA Recombinante	55
Tabla 8	Cálculo de sensibilidad, especificidad y valores predictivos de la prueba ELISA Lisado vs. ELISA Recombinante	56
Tabla 9	Cálculo de concordancia e índice kappa de la dupla inmunocromatográfica (Stat-Pak/InBios) vs. ELISA Recombinante	57

Tabla 10	Cálculo de concordancia e índice kappa de la dupla convencional (HAI/ELISA) vs. ELISA Recombinante	58
Tabla 11	Cálculo de concordancia e índice kappa de la dupla inmunocromatográfica (Stat-Pak/InBios) vs. la dupla convencional (HAI/ELISA)	59
Tabla 12	Cálculo de concordancia e índice kappa de las pruebas inmunocromatográficas InBios vs. Stat-Pak	60
Tabla 13	Cálculo de concordancia e índice kappa de la prueba Stat-Pak vs. ELISA Recombinante	61
Tabla 14	Cálculo de concordancia e índice kappa de la prueba InBios vs. ELISA Recombinante	62
Tabla 15	Cálculo de concordancia e índice kappa de la prueba HAI vs. ELISA Lisado	63
Tabla 16	Cálculo de concordancia e índice kappa de la prueba HAI vs. ELISA Recombinante	64
Tabla 17	Cálculo de concordancia e índice kappa de la prueba ELISA Lisado vs. ELISA Recombinante	65
Tabla 18	Cálculo de la eficiencia o índice de validez de la dupla inmunocromatográfica (Stat-Pak/InBios) vs. ELISA Recombinante	66
Tabla 19	Cálculo de la eficiencia o índice de validez de la dupla convencional (HAI/ELISA) vs. ELISA Recombinante	67
DISCUSIÓN		
Cuadro Nº 1	Cuadro comparativo de parámetros evaluadores de diagnóstico por duplas diagnósticas	70
Cuadro Nº 2	Cuadro comparativo de parámetros evaluadores de diagnóstico por pruebas individuales	71

ÍNDICE DE GRÁFICOS

		Pág.
RESULTADOS DE LA INVESTIGACIÓN		
Gráfico 1	Distribución de la población del estudio de acuerdo a sexo y resultado para Chagas	46
Gráfico 2	Distribución de la población de estudio de acuerdo a grupos de edad	47
Gráfico 3	Distribución de la Infección por Trypanosoma cruzi, de según sexo	48
Gráfico 4	Distribución de la Infección por Trypanosoma cruzi, de según edad	48
Gráfico 5	Seroprevalencia de infección por t. cruzi encontrada en la población de estudio	49

CAPITULO I

INTRODUCCIÓN

I.1. ANTECEDENTES

La enfermedad de Chagas, también conocida como Tripanosomiasis Americana, es una enfermedad de transmisión parasitaria muy frecuente en América Central y del Sur causada por el parásito *Trypanosoma cruzi*. Se estima que entre 16 y 18 millones de personas en todo el mundo están infectadas y que de éstas, cada año mueren 50.000 ¹.

Chagas es una de las 17 enfermedades enumeradas por la Organización Mundial de la Salud como "enfermedades olvidadas". Se estima que de 75 a 90 millones de personas están en riesgo de infección ².

El Banco Mundial ha clasificado a la Enfermedad de Chagas como una de los principales problemas de salud pública de la Región latinoamericana, siendo aún más prevalente que la Malaria o el Dengue. Cada año, 752.000 días de trabajo se pierden debido a muertes prematuras. Existe una pérdida de 1.200 millones de dólares en productividad entre los 7 países del cono sur afectados por esta patología. En el Brasil, la ausencia laboral ocasionada por Chagas, asciende a 5.6 millones de dólares ².

Bolivia es el país más afectado por la enfermedad de Chagas en América Latina, siendo un grave problema de salud pública, debido al gran impacto en la población infantil y adulta joven en edad productiva.

La enfermedad es transmitida por los insectos triatomíneos que viven en las grietas y agujeros de las viviendas pobres, rurales y periurbanas existentes desde sur de Argentina al sur de Estados Unidos, principalmente en América Central y del Sur. Estos insectos hematófagos se infectan cuando pican animales o personas ya infectados con el parásito ¹.

La enfermedad de Chagas puede ser grave en los humanos. Muchas personas se infectan durante la infancia. Generalmente, el estadio temprano de la infección no se considera grave. No obstante, a veces la enfermedad puede provocar la muerte, particularmente en bebés y niños de muy corta edad.

Para un tercio de las personas que padecen Chagas, los síntomas crónicos se desarrollan entre 10 y 20 años después de contraer la infección. Para los que desarrollan estos síntomas crónicos, la esperanza media de vida disminuye una media de 9 años ¹.

En Bolivia, las encuestas nacionales mostraron entre 20 a 60% de seropositividad, siendo la seroprevalencia global, del 10,8% en habitantes de áreas endémicas. De acuerdo a grupos de edad, 1,9% en menores de 1 año, 2,3% en niños de 1 a 4 años, 7,1% en niños de 5 a 14 años y 13,5% en individuos mayores de 15 años ³. La tasa de infección general de 10,8% es la más alta en Latinoamérica y más del 60% del territorio es endémico, comprendiendo los departamentos de Chuquisaca, Tarija, Cochabamba, Santa Cruz, La Paz y Potosí con un total de 115 municipios donde se ha detectado la presencia del vector ⁴.

El impacto socioeconómico, debido a la morbi-mortalidad producida por la infección chagásica, justifica emplear todos los recursos y esfuerzos para el control de la enfermedad. El tratamiento del infectado chagásico, en el marco de las medidas de control, busca limitar el daño producido por el parásito como también reducir e interrumpir la transmisión.

El Programa Nacional de Chagas (PNCH), a partir del año 1999, inició una intervención integral en toda el área considerada endémica del país por la presencia de *Triatoma infestans*, realizando rociado de viviendas tanto en área urbana como en rural. Hasta el momento se han obtenido resultados importantes y ya existen zonas con control vectorial (infestación residual menor a 3%), que son elegibles para la intervención con las actividades de diagnóstico y tratamiento de la enfermedad de Chagas.

Habiéndose declarado a esta enfermedad "De prioridad nacional, la prevención y lucha contra el mal de Chagas en todos los departamentos del país" (*Ley N° 3374 de 23 de marzo de 2006*), se hace indispensable después de más de 10 años de actividades destinadas al control vectorial, y habiéndose reducido notablemente los índices de infestación intra y peridomiciliar, dar respuesta a

esta problemática a través del diagnóstico y tratamiento de los niños y adolescentes que se encuentren infectados, con el objetivo de erradicar la infección y de esta forma curar o detener el curso progresivo de la enfermedad.

El Programa Nacional de Chagas, en su componente diagnóstico y tratamiento de Chagas crónico reciente infantil, tiene como objetivo reducir la morbilidad y la mortalidad por Chagas y disminuir la transmisión de esta infección en la comunidad, para lo cual ha planteado las estrategias para efectuar el diagnóstico, tratamiento y monitoreo post-tratamiento, a los niños con Chagas Crónica Reciente Infantil, basados en recomendaciones, investigaciones y experiencias del ámbito nacional como internacional. Los aspectos operativos importantes respecto al diagnóstico y tratamiento específico, se encuentran desarrollados en el "Manual de Normas Técnicas y Operativas para el Tamizaje, Diagnóstico y Tratamiento de la Enfermedad de Chagas Crónica Reciente Infantil", instrumento normativo, vigente actualmente en nuestro país, para la programación anual de las actividades, para actuar de una manera normada y consensuada en la toma de muestras, tamizaje, diagnóstico, tratamiento y monitoreo post-tratamiento del Chagas infantil ⁸.

La población objetivo para diagnóstico y tratamiento de Chagas comprende a niños de 1 hasta menores de 15 años de edad que residen en territorios considerados endémicos para Chagas, pero donde, por las actividades de control vectorial se ha reducido de manera importante la presencia de vinchucas en el domicilio y el peri-domicilio y la infestación residual no sea mayor al 3% en las viviendas de los niños que serán tratados en la comunidad o municipio, y no presente indicios de colonización por el vector en la vivienda. Un aproximado de 1'000.000 de niños comprendidos en este rango de edad, habitan la extensa zona endémica a Chagas del país, comprendiendo más de la mitad del territorio boliviano. Se estima que un 15 a 20% de estos niños se encuentran infectados y deben beneficiarse de un tratamiento específico contra el Chagas ^{5, 6}.

Se ha demostrado que el tratamiento tiene una gran efectividad en la fase aguda y crónica reciente de la infección y un indudable beneficio en el paciente

con infección crónica de larga duración. El Benznidazol continúa siendo la droga clásica de tratamiento ⁸.

I.2 PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

I.2.1 Planteamiento del problema

- En el Departamento de Chuquisaca, según datos del Programa Departamental de Chagas para la gestión 2013, se estima una seroprevalencia del 5,6 % en niños de 1 a 4 años, 5,4% en niños de 5 a 14 años y del 56,6% en mayores de 15 años. La prevalencia general de Chagas fue de 30,5% ⁷.
- El diagnóstico específico de infección chagásica, tiene características especiales de acuerdo a la fase en la que se encuentra. En la fase aguda de la infección, caracterizada por una elevada parasitemia, se debe buscar los parásitos en sangre circulante y en la fase crónica, donde existe una respuesta humoral estable, se debe buscar la presencia de anticuerpos específicos por métodos serológicos ⁵.
- El diagnóstico de la enfermedad de Chagas se basa de rutina en la realización de pruebas serológicas convencionales, tales como el Inmunoensayo enzimático (ELISA), Inmunofluorescencia indirecta (IFI) y la Hemoaglutinación indirecta (HAI). Y aunque estos métodos se constituyen en una valiosa herramienta diagnóstica, una variación considerable en la reproductibilidad y la exactitud de los resultados se observa con los tres métodos, además de presentar desventajas considerables a la hora de su aplicación en terreno ⁸.
- El diagnóstico confirmatorio de la infección chagásica debe estar dirigido de acuerdo a la fase de la infección. El conocimiento de la aplicación de las técnicas diagnósticas y la interpretación correcta de los resultados, son fundamentales para orientar las acciones de los clínicos, y

bioquímicos, asociando los resultados a la clínica del paciente afectado. También se ha detectado reactividad cruzada frente a antígenos de *T. cruzi* en suero de pacientes con leishmaniasis o infección por *Trypanosoma rangeli*. Para evitar los falsos positivos, se ha propuesto el uso de test serológicos no convencionales basados en antígenos recombinantes, tres de ellos fueron combinados en un único test ELISA que resultó en una alta sensibilidad y especificidad diagnóstica. De acuerdo a estos resultados, un nuevo test inmunocromatográfico, el Chagas Stat-Pak, fue desarrollado por combinación de antígenos de *Trypanosoma cruzi*⁸

- Los estudios realizados utilizando la prueba con muestras de suero han revelado la elevada sensibilidad y especificidad del Chagas Stat-Pak^{8,9}.

En un estudio a doble ciego, el Chagas Stat-PakTM ha permitido detectar personas infectadas y no infectadas con una sensibilidad del 98,5% y una especificidad del 94,8%. El estudio también ha evaluado de forma independiente el suero de cuatro países latinoamericanos registrando una sensibilidad del 100% y una especificidad del 98,6%. Una tercera tanda de análisis comparando sueros con plasma y eluidos de las muestras almacenadas en papel de filtro revelaron resultados idénticos a los obtenidos con el suero¹⁰.

En otro estudio, la efectividad de la prueba rápida Chagas Stat-PakTM se comparó con una prueba diagnóstica ELISA estándar en el serodiagnóstico de la enfermedad de Chagas en América Central, de las 3.400 muestras de donantes de sangre, 4,6% eran positivas en ambos ensayos. Tres sueros de 2.084 muestras de laboratorios de referencia dieron negativo a la prueba rápida; pero positivos al ELISA (con una concordancia de 99%). Se observó una concordancia de 100% entre dos análisis con 339 sueros adicionales de pacientes con cardiopatías y 175 sueros de donantes de sangre potenciales en casos quirúrgicos urgentes. El Chagas Stat-PakTM reveló una sensibilidad y una

especificidad del 99,6% cuando se analizaron 5.998 muestras de suero¹¹.

Un tercer estudio, evaluó el Chagas Stat-Pak™ en muestras de suero canino de zonas endémicas y no endémicas para la enfermedad de Chagas con resultados conocidos de pruebas serológicas. La prueba diagnóstica rápida tenía una especificidad de por lo menos un 94% y una sensibilidad de por lo menos un 96% ¹².

Roddy y col, evaluaron el rendimiento del Chagas Stat-Pak™ en sangre entera. Se detectaron correctamente 113 de los 121 resultados positivos identificados por los análisis convencionales, obteniendo una sensibilidad del 93,4%. Asimismo, de 1.792 resultados negativos según los análisis convencionales, 1.774 fueron categorizados correctamente por la prueba rápida, obteniendo una especificidad del 99,0% ¹³.

- El diagnóstico convencional se realiza rutinariamente en los laboratorios de 2º nivel pertenecientes a centros urbanos grandes. Sin embargo, los pacientes de la enfermedad de la mayoría del Chagas viven en las áreas rurales o peri-urbanas donde no existe acceso a laboratorios equipados, ni los recursos humanos especializados están disponibles.
- Las pruebas serológicas de laboratorio actuales para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas son la prueba ELISA convencional, la prueba ELISA recombinante, y el HAI para Chagas. Estas pruebas si bien presentan una elevada sensibilidad y especificidad, son largas e implican múltiples pasos para obtener la confirmación del diagnóstico. Como consecuencia de ello, existe una mayor probabilidad de error en la clasificación de la enfermedad así como de las personas con Chagas no tratadas debido a las pérdidas en lo que a seguimiento se refiere.
- Asimismo, para diagnosticar la enfermedad, las pruebas serológicas convencionales requieren una capacidad hospitalaria, de laboratorio y

bancos de sangre, sustancial. Estos recursos son limitados, especialmente en zonas rurales donde la enfermedad de Chagas tiene una mayor prevalencia. Las dificultades logísticas en áreas alejadas pueden retrasar la entrega de los resultados, ocasionando así la pérdida de pacientes con un alto costo para la salud.

- Por otra parte, estos complejos protocolos de diagnóstico, requieren de por lo menos dos visitas del paciente al centro de salud o laboratorio.
- La carencia o dificultad de acceso a los centros de la salud con laboratorios inadecuadamente equipados (sin de electricidad, refrigeración y/o análisis serológicos convencionales), carentes de recursos humanos especializados, que proporcionen resultados confirmatorios de manera rápida y eficiente, nos lleva a plantear la posibilidad de ***introducir una nueva metodología de diagnóstico formada por la dupla de dos pruebas rápidas inmunocromatográficas que al desarrollarse en paralelo, utilizando sangre entera como muestra por punción digital, pueda brindar la suficiente confiabilidad y eficiencia, para concluir el diagnóstico en pocos minutos.*** De esta manera, lograr un inicio de tratamiento en el momento, previa orientación y consejería, para así lograr una mayor adherencia al tratamiento.
- En la actualidad, para éste inicio se debe esperar a la confirmación laboratorial, que puede llevar varios días, debido a la inaccesibilidad geográfica de las muchas comunidades rurales. En muchos casos el retorno del personal de salud es dificultoso y más aún la posibilidad de volver a reunir a la población, por lo que después del tamizaje serológico, el paciente ya no retorna por su resultado, lo que conlleva a la pérdida de los pacientes positivos, que dada su edad temprana, podrían haber recibido el beneficio de una mejor calidad de vida en su etapa adulta a futuro.

I.2.2 Formulación del problema.

¿Cuál es la eficacia de las pruebas inmunocromatográficas (Stat-Pak™ e In-Bios™) aplicadas en paralelo, respecto al protocolo convencional (HAI y ELISA) para el diagnóstico de Chagas?

I.2.3 Justificación y uso de los resultados.

Aunque existen varios trabajos (Luquetti et al, Ponce et al, Roddy et al y Sánchez et al) que han demostrado la utilidad del Stat-Pak™ como herramienta de descarte diagnóstico en la enfermedad de Chagas pero con la particularidad de que han sido hechos con confirmación con un solo test (ELISA recombinante) y/o muestras de suero. El interés de este estudio radica en poder demostrar la utilidad de la combinación del Chagas Stat-Pak™ y del Test InBIOS, como herramienta de diagnóstico cuando se desarrollan en forma paralela, utilizando sangre total y en condiciones de campo a fin de agilizar la entrega de los resultados y así mismo el inicio de tratamiento, lográndose así una mejor adherencia al mismo.

En la actualidad en Bolivia y bajo la normativa establecida por el Programa Nacional de Chagas, los análisis serológicos convencionales utilizados para la clasificación de diagnóstico de la infección *del T. cruzi* son: la prueba rápida inmunocromatográfica rápida, como prueba de tamizaje y como ensayos confirmatorios: el inmunoensayo enzimático (ELISA de 2ª generación), la hemaglutinación indirecta (HAI) y el ELISA Recombinante (ELISA de 3ª generación), como análisis de confirmación en casos de discordancias.

La ventaja de utilizar muestras de sangre total es que así se eliminan la necesidad de procedimientos de laboratorio, reduciendo significativamente el número de pasos y la cantidad de tiempo necesario para confirmar el diagnóstico.

Por otra parte, los análisis serológicos convencionales cuando son utilizados en áreas geográficas alejadas y de difícil acceso, pueden perder su alta sensibilidad y especificidad; alcanzadas cuando se realizan en condiciones adecuadas en laboratorios de 2º ó 3º nivel de referencia.

El Chagas Stat-Pak (Chembio Diagnostic Systems, Inc., Medford, NY) es un análisis inmunocromatográfico rápido para detección de anticuerpos *anti- T. cruzi*. Según el fabricante, esta prueba de diagnóstico rápida (de un solo paso) simple (RDT) puede utilizarse con suero, plasma o muestras de sangre entera y se realiza en 15 minutos exactos. Para su conservación, la prueba no se requiere refrigeración, y para su realización no se precisa ni un laboratorio ni personal especializado. Presenta una sensibilidad de 98,5% y una especificidad de 94,8%. Está conformada por los antígenos: B13, 1F8 y H49/JL7; siendo el antígeno más importante el H49 que nos permite discriminar los anticuerpos de tipo IgG característicos de la fase crónica. (Ver Anexo N° 6).

La prueba rápida InBIOS (InBIOS Internacional, Inc., Seattle WA) para la detección diagnóstica de infección de *T. cruzi* en seres humanos es una tira inmunocromatográfica rápida basada en antígenos recombinantes con multi-epítopes, derivados de diversos antígenos de *T. cruzi*, integrado por un total de nueve diferentes epítopes. Esta prueba rápida es utilizada para la detección cualitativa de anticuerpos presentes en el suero o sangre entera del paciente. La lectura del resultado se lleva a cabo en 20 minutos. Para su conservación, la prueba no se requiere refrigeración, siendo su realización fácil y rápida, no siendo necesario de un laboratorio ni personal especializado. Presenta una sensibilidad de 93,3% y una especificidad de 100%, conformada por los antígenos: TcF, SAPA (Shed Acute Phase Antigen), Péptido 36, Kmp 11, Péptido 1^{14, 15}. Esta combinación de antígenos incluye marcadores de fase aguda (SAPA) y de fase crónica. (Ver Anexo N° 7)

Este estudio transversal evaluará en paralelo, la capacidad de dos pruebas inmunocromatográficas rápidas utilizando sangre entera, para clasificar correctamente a individuos como positivos o negativos para la infección de Chagas, en comparación a las pruebas serológicas convencionales, para lo

cual mide la confiabilidad de los resultados en las pruebas rápidas respecto a la metodología convencional.

Una prueba rápida de tamizaje o RDT debe idealmente ser fácil de ejecutar, rápido, incluir pocos pasos y tener una alta sensibilidad y muy buena especificidad. Las pruebas serológicas convencionales requieren tiempo y muchos pasos en su realización, razón por la cual incrementan la probabilidad de errores.

La Organización Mundial de la salud, establece que una prueba ideal debería ser fácil de realizar en un solo paso, rápida y económica, sin la necesidad de requerir equipo especial ni refrigeración de los reactivos y tener además una sensibilidad y especificidad del o cercana al 100% ⁹.

Una RDT ideal sería la de una prueba fácil de utilizar, que proporcione resultados de forma rápida, que incluya una serie limitada de pasos y que tenga una sensibilidad y una especificidad elevadas.

Dos pruebas rápidas empleadas en forma paralelas durante los procedimientos de detección en condiciones de terreno, con una sensibilidad y una especificidad bastante elevadas, agilizaría la orientación preparatoria y el inicio de tratamiento, lo que además supone el no necesitar de la extracción venosa de sangre de los pacientes, lo que facilita y logra una mayor aceptación por parte de los padres y pacientes en especial de los de edades menores.

Las muestras de sangre total, al contrario de lo que ocurre con las muestras de suero o plasma, harían disminuir la necesidad de largos procedimientos de laboratorio para clasificar la enfermedad y así ganar los 2, 3 días e incluso semanas, en que el personal de salud debe esperar para administrar el tratamiento a las personas que lo necesitan mientras esperan la confirmación del diagnóstico.

El propósito de este estudio es evaluar esta metodología de diagnóstico en el ámbito de las comunidades rurales más alejadas y sin acceso a laboratorio y determinar si la dupla conformada por el *Chagas Stat-Pak*TM y el *Test*

InBIOS™, puede utilizarse como herramienta diagnóstica confiable sin la necesidad de precisar de una confirmación serológica con el test de ELISA, lo que supone un ahorro de tiempo y recursos logísticos de laboratorio sobre todo en condiciones en las que se trabaja en terreno rural o poco accesible.

Si la sensibilidad y especificidad de la dupla para diagnosticar la enfermedad de Chagas, cuando la muestra que se utiliza es sangre total, es aceptable o mejor aún comparable a la sensibilidad y la especificidad de las pruebas ELISA y/o ELISA REC para Chagas, ambas RDT podrían convertirse en el método de diagnóstico de primera línea en los programas de vigilancia e intervención en comunidades muy alejadas y de difícil acceso.

I.3 OBJETIVOS

I.3.1 Objetivo General:

Evaluar la eficacia de las pruebas inmunocromatográficas (Stat-Pak™ e InBios™) aplicadas en paralelo, respecto al protocolo convencional (HAI – ELISA) para el diagnóstico de Chagas.

I.3.2 Objetivos Específicos:

1. Valorar la sensibilidad, especificidad y valores predictivos de ambas pruebas inmunocromatográficas (Stat-Pak e InBIOS) frente a la prueba estándar de referencia (ELISA Recombinante) utilizando sangre total en el ensayo.
2. Valorar la sensibilidad, especificidad y valores predictivos de cada una de las pruebas diagnósticas utilizadas actualmente en los protocolos convencionales (HAI y ELISA lisado), frente a la prueba estándar de referencia (ELISA Recombinante).

3. Medir la concordancia de la conclusión diagnóstica obtenida por la dupla inmunocromatográfica (Stat-Pak/InBios) en relación a la serología convencional (HAI/ELISA) y a la prueba estándar de referencia (ELISA Recombinante).
4. Medir la concordancia de los resultados obtenidos con cada una de las pruebas diagnósticas utilizadas en forma convencional (HAI y ELISA lisado) y no convencional (Stat-Pak e InBIOS), entre si y frente a la prueba estándar de referencia (ELISA Recombinante).
5. Valorar la Eficiencia o Valor Predictivo Global de la dupla inmunocromatográfica propuesta y de la dupla convencional.
6. Clasificar serológicamente al grupo poblacional de acuerdo a edad respecto a la infección por *Trypanosoma cruzi*.
7. Clasificar serológicamente al grupo poblacional de acuerdo a sexo respecto a la infección por *Trypanosoma cruzi*.

I.4 HIPÓTESIS

“La aplicación de dos pruebas rápidas en paralelo (*Chagas Stat-Pak™* y *Test InBIOS™*) en sangre total, mantienen una elevada sensibilidad y especificidad en el diagnóstico serológico de la infección por *Trypanosoma cruzi* reduciendo el tiempo y los recursos logísticos empleados para la obtención de los resultados antes del inicio de tratamiento, sobre todo en condiciones en las que se trabaja en terreno y sin acceso a laboratorio”.

CAPITULO II

MARCO TEÓRICO

II.1. MARCO TEÓRICO CONCEPTUAL

II.1.2 La Enfermedad de Chagas y la evolución en su control

La Enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis Americana fue descubierta en 1909 por el médico brasileño, **Dr. Carlos Ribeiro Justiniano das Chagas**, en la región de Minas Gerais, Brasil. Además de describir los principales hitos de una nueva entidad patológica, identificó insectos vectores de ubicación domiciliaria y encontró al agente etiológico de la enfermedad: el parásito *Trypanosoma cruzi*, que circula entre mamíferos de pequeño y mediano tamaño y vectores invertebrados ¹.

La Enfermedad de Chagas es una parasitosis endémica en amplias regiones de América Central y del Sur, donde debido a la alta prevalencia y elevada morbimortalidad que produce entre las poblaciones rurales, marginales y de escasos recursos económicos constituye un verdadero problema de salud y un desafío médico sanitario ⁹.

Desde su descubrimiento, Carlos Chagas ya sospechaba el inmenso daño médico-social que la tripanosomiasis americana podría causar en todo el Continente. Trabajando con los datos del hallazgo del vector infectado que iba recibiendo de investigadores de varios países, con su colega Arthur Neiva, Chagas fue rápidamente conformando un cuadro muy preocupante sobre la dispersión de la enfermedad humana en toda América Latina ⁵.

Todavía, durante la vida de Chagas, el reconocimiento de la enfermedad ha sido muy débil, por falta de definiciones clínicas y laboratoriales, así como de muy poca investigación en áreas endémicas. Fue con los trabajos de Mazza y Romaña, en los años 1930, que la detección de casos agudos ha realmente aumentado, generando registros en Argentina, Uruguay, Brasil, Venezuela y Centro América ^{16, 17}. Es así que hasta 1940, se van esbozando el conocimiento de la enfermedad y se van estableciendo las bases y estrategias definitivas de la lucha antichagásica.

Sin embargo, fue solamente durante los años 1970 y 1980 que arrancaron en definitivo los primeros programas nacionales de control de la enfermedad, priorizando el mejoramiento de la vivienda (Venezuela, partes de Uruguay) y la lucha química de los vectores domiciliados (Argentina, Brasil, Chile y Uruguay)^{18, 9}.

En los fines de los 1980 la Organización Mundial de la Salud (OMS) mencionaba la existencia de 18 millones de infectados y de 100 millones de personas bajo riesgo de contaminación por el *Trypanosoma cruzi*⁹.

Una década antes, en el Brasil, números oficiales estimaban una incidencia de 100 mil casos nuevos anuales, principalmente por cuenta de la transmisión vectorial (80-85%) y transfusional (10-15%). También en aquella fecha, los datos brasileños, argentinos y venezolanos indicaban que entre 20 y 40% de los infectados crónicos ya tenían o podrían tener una cardiopatía chagásica importante, frecuentemente fatal^{5, 19, 20}.

Progresivamente la enfermedad va adquiriendo visibilidad, sea por los datos entomológicos, sea por los de prevalencia y, de algún modo, por los de morbilidad (especialmente los debidos a la cardiopatía crónica). También progresivamente, en especial después de los 1960, incrementase el interés internacional por la enfermedad, particularmente a partir de mayores discusiones y talleres en la Organización Panamericana de la Salud (OPS), también a partir de libros, publicaciones otras y congresos internacionales²⁰.

A partir de las década de los 70 y 80 se van conformando los programas nacionales de control, destacándose resultados muy buenos de control químico, así como significativos avances en la clínica y control Brasil, Argentina, Chile y Uruguay. En los años 1990 arrancan en definitivo las “Iniciativas Intergubernamentales para el Control de la Enfermedad de Chagas” en las Américas, bajo la coordinación de los países involucrados y de la OPS, con resultados concretos en corto-mediano plazo⁵.

Avanzan nuevas lógicas de interacción y trabajo compartido, principalmente en términos de control vectorial y vigilancia, también avanzan los grados de cobertura y calidad en los bancos de sangre. Se retoma y amplifica la discusión sobre el tratamiento específico, especialmente en términos de programas regionales de tratamiento de crónicos en baja edad. La enfermedad adquiere mayor visibilidad por cuenta del aporte de infectados en los centros urbanos, con mayores registros de mortalidad y demanda médico-hospitalaria y de seguridad.

En los últimos años, la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Organización Panamericana de la Salud (OPS) consideran que la enfermedad de Chagas es la enfermedad parasitaria más grave en América Latina y la principal causa de Enfermedades cardíacas de la región. Los vectores de la enfermedad de Chagas (triatominos) se encuentran ampliamente distribuidos desde el sur de los Estados Unidos de Norte América, toda América Central y toda América del Sur. La infección humana se verifica en las regiones donde los triatominos se han domiciliado y viven dentro o en la proximidad de la vivienda humana. En parte de México, prácticamente en todos los países de Centro y Sur América se encuentra la infección humana por *T. cruzi*. Países como Brasil, Venezuela, Colombia, Perú, Paraguay, Bolivia, Norte de Argentina y Chile son los más afectados en América del Sur ^{1, 9}.

Se estima que alrededor de 100 millones de personas en Latinoamérica vive en áreas endémicas para Chagas o sea un 25 % de la población total y por lo tanto se encuentran en riesgo de adquirir la enfermedad, 16 a 18 millones es el número de personas infectadas, de las cuales 5 millones se encuentran clínicamente enfermas con afección de distintos órganos. Se estima que la enfermedad de Chagas produce 1 millón de casos nuevos por año con un promedio de 45 mil muertes, cifra que coincide con las publicadas por la OMS – UNESCO ^{18, 5, 6, 9}.

Chagas es una de las 17 enfermedades enumeradas por la Organización Mundial de la Salud como "enfermedades olvidadas". Causa más de 10.000 muertes por año. De 75 a 90 millones de personas están en riesgo de

infección. El Banco Mundial ha clasificado a la Enfermedad de Chagas como una de las principales problemas de salud pública de la Región latinoamericana, siendo aún más prevalente que la Malaria o el Dengue. Cada año, 752.000 días de trabajo se pierden debido a muertes prematuras. Existe una pérdida de 1.200 millones de dólares en productividad entre los 7 países del cono sur afectados por esta patología. En el Brasil, la ausencia laboral ocasionada por Chagas, asciende a 5.6 millones de dólares ².

II.1.2 La enfermedad de Chagas en Bolivia

En Bolivia, esta enfermedad representa un importante problema de salud pública, las encuestas nacionales revelan entre un 20 – 40 % de seropositividad en habitantes de áreas endémicas: 2,15 % en menores de 1 año, 3,20 % en niños de 1 a 4 años, 7,45 % en niños de 5 a 14 años y 24,11 % en individuos mayores de 15 años ²¹.

Las tasas mencionadas representan las más altas de Latinoamérica. El tamizaje serológico efectuado en el 2002 en bancos de sangre a 34.877 muestras estableció una prevalencia de infección del 12,4%, inferior a la registrada durante los años 1988 y 1999 del 17,5% ²². En 2002, el Ministerio de Salud y Deportes boliviano reportó que la mitad de la población del país corría el riesgo de contraer la enfermedad de Chagas. Otros datos recientes estiman que la tasa de prevalencia de la enfermedad de Chagas es del 40% dentro de la población de riesgo ^{6, 9}.

El área conocida de dispersión de vectores domiciliarios de la enfermedad cubre aproximadamente el 60 % del territorio, en zonas geográficas comprendidas entre 300 a 3.500 m.s.n.m., que comprende los departamentos de Santa Cruz, Tarija, Chuquisaca, Cochabamba y parcialmente Potosí y La Paz ^{6, 9, 23}.

Es importante considerar que de los habitantes de Bolivia el 55 % vive en las zonas de los valles y llanos del territorio nacional, de los cuales 596.603 habitantes viven en el departamento de Chuquisaca, cuyo territorio y población

son los más afectados por la enfermedad, debido a las características climatológicas de esta región, las precarias condiciones de vida de su población y por que es el único departamento del país cuyo territorio en su totalidad, es considerado como área endémica para la enfermedad de Chagas²⁴.

II.1.3 El Parásito

En cuanto se refiere al **agente infeccioso**, el *Trypanosoma cruzi* es un protozoo flagelado que tiene un ciclo evolutivo complejo, adoptando diferentes formas según el hábitat que ocupa durante las diferentes fases de su ciclo ¹⁸.

En sus diversos hospederos (hombre y animales mamíferos) y en medios de cultivo, *T. cruzi*, presenta tres aspectos morfológicos fundamentales: el tripomastigote, el epimastigote y el amastigote.

El *T. cruzi* circula entre seres humanos, insectos vectores domésticos y selváticos y reservorios animales. Su distribución geográfica es mucho más extensa que la de la enfermedad humana.

El proceso de dispersión tanto biológica como geográfica ha evolucionado a tal punto que existe una gran diversidad de subpoblaciones o cepas, las mismas que una vez aisladas de los diversos huéspedes y estudiadas en forma experimental en el laboratorio, exhiben características bien diferenciadas ²⁵.

El *T. cruzi* posee un ciclo complejo y adopta diferentes formas evolutivas, que reflejan una adaptación a las distintas localizaciones biológicas por las que atraviesa este parásito a lo largo de su vida, en el insecto vector y en el mamífero vertebrado ²⁶.

II.1.4 El Vector

Los **vectores** son insectos del orden Hemiptera, de la familia *Reduviidae* y de la subfamilia *Triatominae*, vulgarmente denominados como **vinchucas** en nuestro país. Son insectos de porte relativamente grande, hematófagos estrictos. Muy raramente realizan canibalismo o coprofagia, siendo posible en esta forma la transmisión del *T. cruzi* de vector a vector ^{5,6}.

Poseen hábitos nocturnos y una tendencia a volar muy poco. De modo general, todos los triatominos pueden infectarse por el *T. cruzi*, en cualquier etapa de su vida, al chupar la sangre de un reservorio infectado (hombre, mamíferos salvajes o domésticos). Una vez contaminados ellos permanecen infectados hasta el final de sus vidas ^{5,6}.

Se considera que 6 especies, capaces de adaptarse y colonizar la casa del hombre, presentan una significación epidemiológica importante en América del Sur. Las especies adaptadas al domicilio son: ***Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus* y *Pastrongylus megistus***. Las especies peri domiciliarias son: ***T. brasiliensis*, *T. dimidiata* y *T. sórdida***. Entre las especies silvestres tenemos dos: *T. proctata* y *T. platensis* ⁶.

En Bolivia, dos son las especies de mayor importancia: ***Triatoma infestans* y *Triatoma sórdida***.

T. infestans, es el más antropofílico, siendo así el principal y más importante transmisor de tripanosomas, tanto al hombre como a los animales domésticos que conviven con él, siendo el verdadero responsable de la endemia chagásica en nuestro país. Sus hábitos son exclusivamente domésticos y sus elevados índices de infección con *T. cruzi* ⁶.

II.1.5 Mecanismos de Transmisión a Seres Humanos

Tres son los más importantes: La transmisión Vectorial, la transmisión Transfusional y la transmisión Materno-Fetal o Congénita.

Existen también otros mecanismos (accidental, por transplante de órganos, por vía oral, lactancia), sin embargo constituyen excepciones que no revisten importancia en Salud Pública.

La **Transmisión Vectorial**, es la de mayor significación y se produce por la introducción de los tripomastigotes metacíclicos infectantes, presentes en las heces de las vinchucas y que ésta deposita sobre la piel y mucosas del ser humano o animales al realizar hematofagia. El parásito atraviesa activamente la piel, mucosas o conjuntivas oculares sanas del hospedero o se introducen a través del orificio de la picadura o por solución de continuidad resultante del paciente al rascarse. Se atribuyen a esta forma de transmisión el 80% de los casos de infección en zonas endémicas.

Es importante también mencionar el rol que juegan los animales domésticos (perros, gatos, conejos, gallinas), y silvestres (roedores, armadillos, etc.) en este modo de transmisión vectorial, manteniendo los ciclos domiciliario, peri domiciliario y silvestre de la enfermedad ⁵.

II.1.6 Patología

Se calcula que en zonas endémicas el contacto con el vector ocurre generalmente antes de cumplir los 10 años ⁵.

Se distinguen dos etapas de la enfermedad: Una ***Etapas Aguda*** pasajera puede ser grave en los niños pequeños que desarrollan problemas cardiacos, digestivos y neurológicos, que pueden causar la muerte en 1 a 10% de los casos. Esto se debe a la lisis celular tanto en el sistema retículo endotelial como del tejido muscular cardiaco y esquelético, lo mismo que en el esófago, intestino, tejido nervioso central y autónomo, etc. Esta destrucción se debe a la multiplicación de los parásitos (amastigotes) dentro de la célula. Sin embargo, la mayoría sobrevive y pasa a la ***Etapas Crónica*** de la infección que suele ser asintomática, sin lesiones detectables (denominada ***forma indeterminada***), aunque a veces se desarrolla una forma clínica que puede ser mortal y origina alteraciones nerviosas motoras, del tubo digestivo, y la cardiopatía crónica

chagásica, la misma que provoca casi todas las muertes atribuidas a la enfermedad de Chagas. Las fases indeterminada y crónica se caracterizan por una reducción de la parasitemia y presencia de nidos de amastigotes en algunos órganos como corazón y tubo digestivo.

A nivel cardíaco, se observan áreas de fibrosis, infiltrados mononucleares y edema-lesiones del músculo contráctil y del sistema de conducción. El corazón está agrandado por dilatación e hipertrofia y se puede observar el aneurisma del ventrículo izquierdo. En el tubo digestivo se desarrollan las megavíceras (megacolon y megaesófago) por denervación y destrucción de neuronas del sistema autónomo, presencia de infiltrados mononucleares y fibrosis ^{5,6}.

II.1.7 Diagnóstico

Las técnicas y estrategias de diagnósticos deberán depender de la fase de la infección y también del propósito y del ámbito del caso. En principio se considera que en la fase aguda de la infección se debe buscar los parásitos en sangre circulante y en la fase indeterminada y crónica los métodos de diagnóstico son serológicos ^{1,6}.

La infección por *T. cruzi*, produce una respuesta inmunoestable, lo que permite que durante la fase crónica de la infección, el diagnóstico se efectúe mediante la detección de anticuerpos IgG, específicos a través de pruebas convencionales y no convencionales.

Es importante mencionar la importancia de los métodos de **Tamizaje Serológico** en especial en aquellos lugares endémicos en los que la población no cuenta con un fácil acceso a un laboratorio de 2º nivel. Para el tamizaje, una de las pruebas a utilizar es el *Test Rápido de Inmunocromatografía*, capaz de detectar anticuerpos frente al *Trypanosoma cruzi*. El test emplea una única combinación de una proteína unida a un anticuerpo altamente específico que se conjuga con partículas muertas y antígenos recombinantes de *T. cruzi*, que están ligados a la membrana o fase sólida ^{10,27}.

En cuanto al *Diagnóstico Laboratorial*, tenemos a los Métodos Parasitológicos, los que pueden ser a su vez directos o indirectos. Los Directos permiten la observación directa del parásito en la sangre periférica. Las técnicas directas antiguamente empleadas fueron: Examen al Fresco y Gota Gruesa. Sin embargo las más empleadas y que presentan la mejor sensibilidad son: el Strout, Microstrout y Micrométodo. Los Indirectos, son aquellos en los cuales se plantea la multiplicación del parásito, aumentando así las posibilidades de detección: Hemocultivo, Xenodiagnóstico, Xenocultivo y Reacción en Cadena de la Polimerasa o PCR.

También tenemos Métodos Inmunológicos, que buscan anticuerpos de la clase IgG. Entre ellos tenemos los siguientes: Hemaglutinación Indirecta (HAI), Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) y el Inmunoensayo enzimático (ELISA) de 2ª y 3ª generación. La especificidad de las pruebas inmunológicas es muy variable de modo que es necesario precisar sus valores límites locales de positividad usando una batería de sueros de referencia. También es recomendada la utilización de dos técnicas serológicas para confirmar la infección ^{18, 1, 6}.

- ***Hemaglutinación Indirecta (HAI) para Chagas.***

Esta es una técnica de diagnóstico indirecto que se basa en la detección de anticuerpos aglutinantes específicos anti-*T. cruzi* presentes en los sueros de enfermos chagásicos, para ello, el antígeno soluble de *T. cruzi* es fijado a la superficie de glóbulos rojos, que previamente han sido tratados por un agente químico que asegura una unión sólida y estable entre las proteínas antigénicas y la superficie de los glóbulos rojos que se comportan como simples partículas inertes capaces de absorber antígenos parasitarios y que habiendo sido sensibilizados de esta manera, se aglutinan cuando son puestos en presencia de diferentes diluciones de los sueros estudiados y que contienen anticuerpos específicos anti-*T. cruzi*.

Como en el suero tanto de individuos infectados como de los no infectados, pueden existir anticuerpos inespecíficos, especialmente anticuerpos heterófilos,

estos deben investigarse, enfrentando el suero con glóbulos rojos no sensibilizados. Si se produce aglutinación de los glóbulos rojos no sensibilizados en presencia de los sueros, estos deben tratarse con Mercapto-etanol para eliminar los anticuerpos heterófilos ⁶.

Esta técnica presenta una sensibilidad relativa, mayor en las formas crónicas que en las agudas (100%), la especificidad relativa se considera buena (98%), la exactitud relativa es del 100%.

- ***Ensayo Inmunoenzimático o ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay).***

Esta técnica se basa en la adsorción pasiva del antígeno soluble de *T. cruzi* en un soporte o fase sólida (superficie de poliestireno) constituido por los pocillos de las placas de microtitulación. Este antígeno es puesto en contacto con los anticuerpos presentes en el suero de los enfermos chagásicos, en dilución apropiada y los complejos antígeno-anticuerpo formados son detectados mediante un suero anti-gammaglobulina humana marcado con una enzima (conjugado) cuya presencia es a su vez revelada, aún en concentraciones mínimas, gracias a un sustrato específico para la enzima y una sustancia cromógena, que es normalmente incolora pero que en contacto con la sustancia producida por la reacción enzimática tiene la capacidad de colorearse ⁶.

La sensibilidad del método es del 100 % y la especificidad del 99.6%. (Ver Anexo 8)

II.1.8 Validez aceptable de un método diagnóstico

No existe un parámetro guía útil para evaluar la validez aceptable de un método diagnóstico en todas las situaciones. La aceptabilidad de la validez de un test depende de la enfermedad estudiada y de las condiciones reales en el medio y en la colectividad.

Si lo que interesa es detectar el mayor número posible de enfermos, se debe usar un test con alta sensibilidad. Así se escapan pocos, aunque al precio de bastantes “falsos positivos”.

Se elegirá un test sensible cuando:

- La enfermedad sea grave y no pueda pasar desapercibida.
- La enfermedad sea tratable.
- Los resultados falsamente positivos no supongan un traumatismo psicológico en los individuos examinados ²⁸.

Si lo que se busca es “asegurar” el diagnóstico, se debe usar un test cuya especificidad sea máxima. Se utilizará un test lo más específico posible cuando:

- La enfermedad sea importante, pero difícil de curar o incurable.
- Los resultados falsamente positivos puedan suponer un trauma psicológico para el individuo examinado.
- El tratamiento de los falsos positivos pudiera tener graves consecuencias ²⁸.

II.1.9 Epidemiología

La enfermedad de Chagas en Bolivia, constituye un serio problema de Salud Pública tanto por su magnitud como por su impacto, estimándose que cerca al 40% de la población residente en el área endémica está infectada y alrededor de 3'222.900 millones de los bolivianos están en riesgo, de los que 1.2 millones estarían infectados. La zona endémica cubre el 80% de la superficie del país, que supera 1 millón de km² e incluye siete de los nueve departamentos ⁷.

Estudios de investigación en el año 1994, mostraban una seroprevalencia del 40,3% para la población total del país, alcanzando en algunas áreas sobretodo rurales del 50 al 70% de positividad ²⁹.

Datos provenientes del Programa Piloto de Control de Chagas SNS-CCH, y ejecutado por el Proyecto de Salud Infantil y Comunitaria (CCH), en áreas

rurales de los departamentos de Cochabamba, Tarija y Chuquisaca, en el año 1991 mostraban una prevalencia del 78,1% para este último departamento, de la cual se destaca que el 11,3 % de pacientes infectados corresponden a pacientes menores de 1 año, y el 40,6 %, a pacientes de 1 a 5 años ⁶.

En el departamento de Chuquisaca, se considera área endémica a más del 90% de su territorio, encontrándose afectadas las 10 provincias y los 29 municipios. Actualmente, la infestación global triatómica en el departamento es del 2,37%, siendo 0.87% en intra-domicilio y del 1,45% en peri-domicilio. Por otra parte, la infección en las Gestantes es del 34,8%. La incidencia de Chagas Congénito: 2,5%, la Prevalencia de Chagas Crónico Infantil: 11,3%, la Prevalencia de Chagas Crónico del Adulto: 53,4% y la Prevalencia general de Chagas: 25,5%, de acuerdo a datos oficiales del PDCH (2002 – 2013). La prevalencia de Chagas en donantes de sangre es del 11%, según datos oficiales del Banco Departamental de Sangre de Chuquisaca.

II.1.10 Métodos de Prevención y Control

El control de la Enfermedad de Chagas se basa en el diagnóstico y el tratamiento de los enfermos, la lucha contra los vectores y la prevención de las vías de transmisión no vectoriales. En 1991 los Ministros de Salud de Argentina, Bolivia, Brasil, Chile, Paraguay y Uruguay conformaron la Iniciativa del Cono Sur y emitieron una resolución sobre el control de la Enfermedad de Chagas y elaboraron un programa de control basado en dos puntos fundamentales:

- La interrupción de la transmisión vectorial de la infección, mediante la eliminación de *Triatoma infestans* domiciliario.
- La disminución del riesgo de transmisión transfusional de donantes infectados ^{1,6}.

II.2. MARCO CONTEXTUAL

La presente investigación se desarrolló en la ciudad de Sucre, capital de la provincia Oropeza, del Departamento de Chuquisaca, en el Estado Plurinacional de Bolivia.

El Municipio de Sucre está distribuido en 8 Distritos de Salud, 5 de los cuales se encuentran dentro del área urbana y 3 en el área rural. Dentro del Distrito I – Central, se encuentra geográficamente establecido el Laboratorio Departamental de Referencia, dependiente de la Unidad de Epidemiología del Servicio Departamental de Salud (SEDES) de Chuquisaca.

El Laboratorio Departamental de Referencia (LDR), es un laboratorio de Nivel III de Referencia Epidemiológica, que concentra a todas las áreas de Diagnóstico de los Programas Epidemiológicos del Ministerio de Salud de Bolivia, a nivel regional.

Cuenta con 9 áreas, a saber: Chagas, Malaria, Dengue (Enfermedades de Transmisión Vectorial), Tuberculosis, Vigilancia Epidemiológica de Enfermedades Emergentes (Virosis y Bacterianas), Parasitología, ITS/VIH, Micronutrientes y Bioquímica Clínica. Cada una de las mismas coordina funcionalmente con los respectivos programas epidemiológicos del SEDES.

El área Chagas del LDR, constituye además el Componente de Diagnóstico del Programa Departamental de Chagas, llevando a cabo actividades de implementación, coordinación, seguimiento, monitoreo y evaluación de las actividades referidas al diagnóstico de esta importante patología en el departamento de Chuquisaca. Por otra parte, está a cargo de desarrollar el Programa de Evaluación Externa de la Calidad en serología para Chagas, en la Red de Laboratorios de Chuquisaca, asumiendo de esta manera el carácter rector, técnico-normativo en relación al Diagnóstico de Chagas, de acuerdo a las directrices nacionales e internacionales en vigencia.

Para el estudio, se incluyeron también a los pacientes pertenecientes a la Plataforma de Atención Integral al Paciente con Enfermedad de Chagas, que

se constituye en el brazo operativo del Programa Departamental para la atención clínica de los pacientes adultos con Chagas. La Plataforma, funciona con fondos provenientes de la Cooperación Externa Española a través de la Fundación Clinic de Barcelona y el CEADES (Colectivo de Estudios Aplicados y Desarrollo Social).

CAPITULO III

MARCO METODOLÓGICO

III.1. ENFOQUE DE INVESTIGACIÓN

El presente estudio tiene un enfoque cuantitativo.

III.2. TIPO Y DISEÑO DE INVESTIGACIÓN

Se constituye en una **valoración de pruebas diagnósticas** (tamizaje poblacional), siendo así, un estudio de **corte transversal**, debido a que se realiza en un periodo de tiempo determinado (de marzo a mayo de 2014), **descriptivo**, puesto que explica el comportamiento de las pruebas a evaluar y **analítico**, porque los resultados obtenidos son sometidos a un análisis estadístico, a fin de probar o no la hipótesis planteada.

Se realiza a doble ciego debido a que existen 3 observadores diferentes, uno para el Stat-Pak™, otro para el test InBIOS™ y otro para la serología convencional (ELISA, HAI y ELISA REC de acuerdo a protocolo establecido).

III.3. POBLACIÓN Y MUESTRA

III.3.1 Población o Universo.

Participaron del estudio todos aquellos pacientes de 1 a <60 años de edad que acudieron al LDR, con solicitud médica o personal para diagnóstico de Chagas, que no hubieron realizado previamente tratamiento para Chagas y que, a través de la firma de un consentimiento informado, accedieron voluntariamente a participar del estudio de forma totalmente gratuita. También participaron los pacientes que acudieron a la Plataforma de Atención Integral al Paciente Chagásico de Sucre. Parte del personal del Laboratorio de Chagas, se desplazó diariamente hasta la Plataforma para la realización de la toma de muestra de estos pacientes. Simultáneamente, los pacientes que acudieron directamente al LDR, fueron atendidos en ambientes del mismo en los horarios habituales de toma de muestra, haciendo un total de 342 pacientes.

III.3.2 Muestra.

- **Tamaño de la muestra**

No se tomó tamaño de muestra porque se trabajó con el total de la población.

III.4. VARIABLES DEL ESTUDIO

III.4.1 Identificación de Variables.

La capacidad de las pruebas inmunocromatográficas (RDT) de clasificar correctamente a las personas como positivas o negativas con respecto a la enfermedad de Chagas será evaluada a través de la *Sensibilidad* y *Especificidad* de ambas pruebas evaluadas como dupla. Los resultados de cada una de ellas se compararán a los de la prueba estándar por excelencia, ELISA Recombinante para determinar la *Concordancia* de la metodología propuesta (Stat-Pak™ e InBIOS™) vs la metodología convencional manejada según protocolo nacional (Stat-Pak™ – ELISA).

La **sensibilidad** se define como la proporción de pacientes con infección Chagas confirmada a través de la prueba ELISA Recombinante (prueba estándar de referencia) que fueron correctamente identificados mediante las RDT Chagas Stat-Pak™ e InBIOS™.

La **especificidad** se define como la proporción de personas sin Chagas según la prueba estándar por excelencia que fueron correctamente identificados como negativos a través de las RDT Chagas Stat-Pak™ e InBIOS™.

El **valor predictivo** de una prueba se define como la proporción de pacientes detectados como positivos o negativos a través de las RDT y que realmente tienen o no la infección. A diferencia de la sensibilidad y la especificidad de la prueba, que puede considerarse como característica de la prueba que se utilice, el valor predictivo se ve afectado por la prevalencia de la enfermedad y por la especificidad de la prueba, cuando la enfermedad no es frecuente. Por

esta razón los resultados se interpretarán teniendo en cuenta la prevalencia de la infección dentro de la población que cubre el estudio durante la fase de análisis del mismo.

El **porcentaje de concordancia** de una prueba, es la medida que representa la proporción de observaciones en las cuales los observadores reportan resultados iguales, mide por tanto la variabilidad entre observadores. No considera la posibilidad de que las coincidencias sean debidas al azar. Entre los diversos indicadores construidos para hacer esta evaluación, se utilizó el **índice o coeficiente kappa**, que considera en su cálculo el papel que pudo tener el azar en la coincidencia de las observaciones ^{30, 31}.

Así mismo se determinó la **eficiencia diagnóstica** o también denominado **índice de validez, proporción correcta de aciertos, valor predictivo global** o **exactitud diagnóstica** de la prueba, que indica la proporción de resultados válidos entre el conjunto de resultados. Se define como la proporción de individuos clasificados correctamente.

III.4.2 Diagrama de Variables.

El diagrama de operacionalización de variables se encuentra descrito a detalle a continuación:

III.4.3 Operacionalización de Variables

OBJETIVO ESPECÍFICO	VARIABLE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	TIPO DE VARIABLE	DEFINICIÓN OPERACIONAL (INDICADORES)	INSTRUMENTOS
<p>1. Valorar la Sensibilidad, Especificidad y Valores Predictivos de ambas pruebas inmunocromatográficas (Stat-Pak e InBios) frente al estándar de referencia (ELISA Recombinante) utilizando sangre total en el ensayo.</p> <p>2. Valorar la Sensibilidad, Especificidad y Valores Predictivos de cada una de las pruebas diagnósticas utilizadas actualmente en los protocolos convencionales (HAI, ELISA lisado), frente a la prueba estándar de referencia (ELISA Recombinante).</p>	Sensibilidad	Proporción de pacientes CON infección Chagas confirmada a través de la prueba ELISA Recombinante (estándar de referencia), que fueron correctamente identificados mediante las RDT Chagas Stat-Pak e InBIOS.	Cuantitativa Discreta Ordinal	<p>a. S. Alta: 90 - 100 %</p> <p>b. S. Media: 70 - 89 %</p> <p>c. S. Baja: < 70 %</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Tablas de contingencia
	Especificidad	Proporción de personas SIN Chagas según las pruebas estándares por excelencia que fueron correctamente identificados como negativos a través de las RDT.	Cuantitativa Discreta Ordinal	<p>a. E. Alta: 90 - 100%</p> <p>b. E. Media: 70 – 89%</p> <p>c. E. Baja: < 70 %</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Tablas de contingencia
	Valor Predictivo	Proporción de pacientes detectados como positivos o negativos a través de las RDT y que realmente tienen o no la infección.	Cuantitativa Discreta Nominal	<ul style="list-style-type: none"> • Valor predictivo (+) • Valor predictivo (-) 	<ul style="list-style-type: none"> • Tablas de contingencia
3. Medir la Concordancia de la conclusión diagnóstica obtenida por la dupla inmunocromatográfica (Stat-	Concordancia	Analogía de resultados respecto a los obtenidos con la metodología convencional o con una prueba	Cuantitativa Discreta Ordinal	<p>a. Excelente: > 0.90</p> <p>b. Muy Buena: 0.81 - 0.90</p> <p>c. Buena: 0.61 - 0.80</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Registro de datos • Tablas de contingencia

<p>Pak/InBios) en relación a la serología convencional (HAI/ELISA) y a la prueba estándar de referencia (ELISA Recombinante).</p> <p>4. Valorar la Concordancia de los resultados obtenidos con cada una de las pruebas diagnósticas utilizadas en forma convencional (HAI y ELISA lisado) y no convencional (Stat-Pak e InBIOS), entre si y frente a la prueba estándar de referencia (ELISA Recombinante).</p>		<p>estándar de referencia.</p> <p>El porcentaje de concordancia de una prueba, es la medida que representa la proporción de observaciones en las cuales los observadores reportan resultados iguales.</p>			
<p>5. Medir la Eficiencia o Valor Global de la dupla inmunocromatográfica propuesta y de la dupla convencional.</p>	Eficiencia	<p>Es la probabilidad de que un individuo sea clasificado correctamente por la prueba. Indica la proporción de resultados válidos entre el conjunto de resultados.</p>	Cuantitativa Discreta Ordinal	<p>a. Óptima: > 0.90 b. Muy Buena: 0.81 - 0.90 c. Buena: 0.61 – 0.80</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Registro de datos • Tablas de contingencia
<p>6. Clasificar serológicamente al grupos poblacional de acuerdo a Edad respecto a la infección por Trypanosoma cruzi.</p>	Edad	<p>Tiempo transcurrido a partir del nacimiento de un individuo.</p>	Cuantitativa Discreta Ordinal	<p>a. 0 – 4 años b. 5 – 14 años c. 15 – 59 años</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Registro de datos
<p>7. Clasificar serológicamente al grupos poblacional de acuerdo a Sexo respecto a la infección por Trypanosoma cruzi.</p>	Sexo	<p>Variable biológica y genética que divide a los seres humanos en dos posibilidades solamente: mujer u hombre.</p>	Cualitativa Discreta Nominal	<ul style="list-style-type: none"> • Hombres • Mujeres 	<ul style="list-style-type: none"> • Registro de datos

III.5. CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN

III.5.1 Inclusión.

Se incluyen de manera consecutiva a todos aquellos individuos que acuden al Laboratorio de Referencia de Chagas y a la Plataforma de Atención Integral al Paciente Chagásico de Sucre, de los cuales se obtiene el consentimiento informado y por escrito de los respectivos padres o tutores en el caso de ser menores de 18 años. Los mayores de 18 años accedieron al estudio igualmente por consentimiento voluntario y escrito. *(Ver Anexo N° 9)*

III.5.2 Exclusión.

No fueron incluidos en la investigación aquellos pacientes que no desearon participar del estudio y/o aquellos que ya recibieron tratamiento previo y que requerían serología post-tratamiento.

III.6 PROCEDIMIENTOS PARA LA RECOLECCIÓN DE LA INFORMACIÓN

III.6.1 Fuente de recolección.

En el LDR de Chagas, se cuenta con un Registro Diario de Pacientes, que solicitan el diagnóstico serológico para Chagas. Se asignó un código para cada paciente participante y esta información fue transcrita al instrumento diseñado para la investigación. *(Ver Anexo N° 2)*

III.6.2 Procedimiento Técnico para el Diagnóstico de la Enfermedad de Chagas.

Las técnicas y estrategias de diagnósticos empleadas dependen de la fase de la infección y también del propósito y del ámbito del caso. En principio se considera que en la fase indeterminada y crónica los métodos de diagnóstico son serológicos.

Es importante mencionar la importancia de los métodos de Tamizaje Serológico en especial en aquellos lugares endémicos en los que la población no cuenta con un fácil acceso a un laboratorio de 2º nivel. Para el tamizaje, una de las pruebas a utilizar es el Test Rápido de Inmunocromatografía, capaz de detectar anticuerpos frente al *Trypanosoma cruzi*. El test emplea una única combinación de una proteína unida a un anticuerpo altamente específico que se conjuga con partículas muertas y antígenos recombinantes de *T. cruzi*, que están ligados a la membrana o fase sólida.

Los Métodos Inmunológicos, que buscan anticuerpos de la clase IgG. Entre ellos tenemos: Hemaglutinación Indirecta (HAI), Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) y el Inmunoensayo enzimático (ELISA) de 1ª y 3ª generación. La especificidad de las pruebas inmunológicas es muy variable de modo que es necesario precisar sus valores límites locales de positividad usando una batería de sueros de referencia. También es recomendada la utilización de dos técnicas serológicas para confirmar la infección.

En caso de existir discordancia en los resultados de ambas pruebas, es necesaria la confirmación de la conclusión diagnóstica utilizando una tercera prueba de mayor especificidad. Para tal efecto se recomienda la utilización de IFI o ELISA RECOMBINANTE.

Esta última prueba (ELISA Recombinante), fue elegida como Prueba Estándar de Referencia (*Gold Standar*) debido a las características diagnósticas que presenta. Los resultados obtenidos con esta técnica, muestran una mejor sensibilidad y especificidad de los ensayos basados en extracto total del parásito.

En esta técnica semicuantitativa para la detección de anticuerpos anti-*T. cruzi*, la muestra se diluye en el soporte en el que se encuentran inmovilizados seis antígenos recombinantes (SAPA, 1, 2, 13, 30 & 36). Estos antígenos son proteínas específicas de etapas epimastigote y

tripomastigote de *T. cruzi*, corresponden a zonas altamente conservadas entre diferentes cepas, obteniéndose una técnica de 3º generación.

Se realiza en placas cuyos pocillos han sido activados con extractos totales de las cepas de *T. cruzi* (Tulahuén y Mn), incluyendo antígenos de membrana altamente inmunogénicos. El recubrimiento de los pocillos se realiza mediante una novedosa tecnología consistente en la utilización de un adhesivo biológico que facilita la inmovilización de los antígenos y aumenta la estabilidad de la placa activada.

La tecnología empleada permite asegurar una mezcla antigénica de composición conocida y constante, brindando resultados reproducibles, específicos y con una elevada sensibilidad. La sensibilidad del ELISA RECOMBINANTE varía entre el 99.3 y el 100%, la especificidad entre el 98.7 y el 100%.

Cada uno de los procedimientos técnicos para el diagnóstico de Chagas, se encuentran detallados en el *Anexo N° 8*.

III.6.3 Instrumento.

La información referente a los resultados obtenidos con cada una de las metodologías de diagnóstico utilizadas, tanto las inmunocromatográficas, como las convencionales, será recogida en el Registro de Datos Comparativos, diseñado especialmente para este fin. (*Ver Anexo N° 2*)

El Registro de Datos solo llevará la codificación de las muestras, además de la fecha, edad y sexo de los individuos testeados.

III.7 PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS DE LOS DATOS

Los datos para cada participante en el estudio se introdujeron en Microsoft Excel® y analizaron con EPIDAT3. Se efectuó un análisis descriptivo detallando la distribución por edad y género de la población estudiada. También se analizó el número y porcentaje de resultados negativos y positivos para cada prueba realizada.

Se presentaron tablas de 2 x 2, mostrando el número de positivos verdaderos, negativos verdaderos, falsos positivos y falsos negativos para ambas RDT (Stat-Pak™ e InBIOS™) utilizando ELISA Recombinante como pruebas estándares de referencia. (Ver Tabla 1 como ejemplo).

Se calculó la sensibilidad, especificidad y los valores predictivos positivos y negativos.

La sensibilidad (S) se calculó con la fórmula $VP / (VP + FN)$. Asimismo, la especificidad (E) con la fórmula $VN / (VN + FP)$. El valor predictivo positivo (VPP) se calculó utilizando la fórmula $VP / (VP + FP)$ y el valor predictivo negativo (VPN) mediante la fórmula $VN / (VN + FN)$. (Ver Anexo N° 3)

Tabla 1. Ejemplo de una tabla de 2 x 2 presentando a los verdaderos positivos, los verdaderos negativos, los falsos positivos y los falsos negativos a través de la dupla diagnóstica inmunocromatográfica Chagas (Stat-Pak™ e InBios™) en relación a un estándar de referencia.

	POSITIVO con ELISA REC (persona con Chagas)	NEGATIVO con ELISA REC (persona sin Chagas)
POSITIVO con la dupla Stat-Pak e InBios	Verdaderos Positivos VP	Falsos Positivos FP
NEGATIVO con la dupla Stat-Pak e InBios	Falsos Negativos FN	Verdaderos Negativos VN

Tabla 2. Ejemplo de una tabla de 2 x 2 presentando a los verdaderos positivos, los verdaderos negativos, los falsos positivos y los falsos negativos a través de la dupla Stat-Pak™ e InBIOS™ en relación a la metodología convencional.

	POSITIVO con dupla convencional HAI y ELISA (persona con Chagas)	NEGATIVO con dupla convencional HAI y ELISA (persona sin Chagas)
POSITIVO con la dupla Stat-Pak e InBios	Verdaderos Positivos VP	Falsos Positivos FP
NEGATIVO con la dupla Stat-Pak e InBios	Falsos Negativos FN	Verdaderos Negativos VN

Se calculó también el **Coefficiente Kappa** para determinar el grado de concordancia entre la metodología propuesta y la convencional. Para mostrar los resultados se elaboró una tabla de contingencia de 2 x 2 con el número de acuerdos/desacuerdos entre los resultados de cada una de las pruebas diagnósticas convencionales (HAI y ELISA) y las no convencionales (Stat-Pak e InBios), frente a la prueba Gold Estándar (ELISA Recombinante). Los resultados obtenidos se interpretaron en base a los criterios propuestos por Landis y Koch, e función del índice o coeficiente kappa. Para el cálculo del índice kappa se utilizó la fórmula: $k = P_o - P_e / 1 - P_e$, en donde, la Proporción de la concordancia observada es: $P_o = (a + d) / n * 100$, y la Proporción de la Concordancia esperada por el azar es: $P_e = [(a + b) (a + c)] + [(c + d) (b + d)] / (a + b + c + d)^2$. (Ver Anexo 4)

Tabla 3. Ejemplo de una tabla de 2 x 2 presentando a los verdaderos positivos, los verdaderos negativos, los falsos positivos y los falsos negativos a través de la dupla convencional HAI y ELISA en relación al estándar de referencia.

	POSITIVO con ELISA REC (persona con Chagas)	NEGATIVO con ELISA REC (persona sin Chagas)
POSITIVO con la dupla convencional HAI y ELISA	Verdaderos Positivos (a) VP	Falsos Positivos (b) FP
NEGATIVO con la dupla convencional HAI y ELISA	Falsos Negativos (c) FN	Verdaderos Negativos (d) VN

Tabla 4. Criterios de Interpretación de Landis y Koch

Kappa	Grado de concordancia
< 0	Sin concordancia
0 – 0,2	Insignificante
0,21 – 0,40	Bajo
0,41 – 0,60	Moderado
0,61 – 0,80	Bueno
0,81 – 0,90	Muy bueno
0,91 – 1,00	Excelente

De acuerdo a la escala de interpretación de Landis y Koch se considera como aceptable un valor mayor a 0,40 y excelentes los valores superiores a 0,75. Para que una RDT se considere una medida de buena fiabilidad, el coeficiente Kappa debe ser superior a 0,80. El nivel de significación estadística se establecerá en 0,05 ³².

Se trabajó a **doblo ciego** debido a que existirán 3 observadores diferentes, uno para el Stat-Pak™, otro para el test InBIOS™ y otro para la serología convencional (ELISA, HAI y ELISA REC, de acuerdo a protocolo establecido), ninguno de los observadores conocía el resultado de los demás.

De igual manera se calculó la **Eficiencia** también llamada Índice de Validez, Proporción Correcta de Aciertos o Valor Predictivo Global de cada una de las pruebas evaluadas y de las convencionales, así como de las duplas propuestas y de las duplas convencionales. Para ello se utilizó la fórmula:

$$E = (VP + VN) / (VP + FP + FN + VN) * 100.$$

Así, en el numerador aparecen los enfermos con resultado positivo (a = verdaderos positivos) y los sanos con test negativo (d = verdaderos negativos), mientras que en el denominador se encuentran todos los sujetos. (Ver Anexo 3)

Se define como la proporción de individuos clasificados correctamente. En términos de la tabla 2 x 2 básica, el índice de validez responde a la siguiente fórmula:

III.8 DELIMITACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

III.8.1 Delimitación Geográfica.

La investigación se realizó en el Área Chagas del Laboratorio Departamental de Referencia, dependiente de la Unidad de Epidemiología del Servicio Departamental de Salud de Chuquisaca y en la Plataforma de Atención Integral al Paciente con Enfermedad de Chagas, dependiente de la Cooperación Externa Española a través de la Fundación Clinic de Barcelona y el CEADES (Colectivo de Estudios Aplicados y Desarrollo Social).

III.8.2 Sujetos participantes del estudio.

Participaron del estudio todos aquellos pacientes de 1 a <60 años de edad que acudieron al LDR y a la Plataforma de Atención Integral al Paciente con Enfermedad de Chagas, con solicitud médica o personal para diagnóstico de Chagas y que accedieron voluntariamente a participar del estudio de forma totalmente gratuita.

A todos los sujetos incluidos se les realizó punción digital para la realización de las pruebas rápidas inmunocromatográficas (Stat-Pak e InBIOS) y una muestra de sangre venosa para la realización de la serología convencional (HAI, ELISA

Lisado de 2^a generación y ELISA Recombinante) con el fin de verificar la concordancia.

III.8.3 Delimitación Temporal.

Los procedimientos de detección se realizaron en 342 pacientes que acudieron al LDR ya la Plataforma de Chagas, en los meses de Marzo a Mayo de 2014.

III.8.4 Alcances y Limitaciones.

El presente estudio pretende demostrar la utilidad de la combinación de dos pruebas inmunocromatográficas en paralelo y utilizando sangre entera en condiciones de terreno de difícil accesibilidad a un laboratorio de 2^o nivel capaz de confirmar el tamizaje previo, con la finalidad de lograr un ahorro de tiempo importante para el inicio de tratamiento para Chagas, considerando que por las condiciones geográficas accidentadas y las distancias importantes para llegar a estas comunidades rurales, esta labor se ve dilatada a riesgo casi siempre, de perder a los pacientes positivos.

La ventaja de utilizar muestras de sangre total es que así se eliminan la necesidad de procedimientos de laboratorio, reduciendo significativamente el número de pasos y la cantidad de tiempo necesario para confirmar el diagnóstico.

Dos pruebas rápidas empleadas en forma paralela durante los procedimientos de detección en condiciones de terreno, con una sensibilidad y una especificidad bastante elevadas, agilizaría la orientación preparatoria y el inicio de tratamiento, lo que además supone el no necesitar de la extracción venosa de sangre de los pacientes, lo que facilita y logra una mayor aceptación por parte de los padres y pacientes en especial de los de edades menores.

Si la sensibilidad y especificidad de la dupla para diagnosticar la enfermedad de Chagas, cuando la muestra que se utiliza es sangre total, es aceptable o mejor aún comparable a la sensibilidad y la especificidad de las pruebas ELISA y/o ELISA Recombinante para Chagas, ambas RDT podrían convertirse en el

método de diagnóstico de primera línea en los programas de vigilancia e intervención en comunidades muy alejadas y de difícil acceso.

Sin embargo una de las principales limitaciones es el poco acceso a una mayor cantidad de opciones comerciales de pruebas rápidas, que permitan su validación en terreno, además de los precios que si bien son ciertamente accesibles, no son mucho menores que los de las pruebas serológicas convencionales utilizadas de rutina.

III.8.5 Cuestiones éticas.

El protocolo final de este estudio fue presentado a la Universidad Andina Simón Bolívar para su aprobación. Así mismo, se presentó tanto al Programa Departamental y Nacional de Chagas para su conocimiento y aprobación. Posteriormente y para su co-financiamiento, se presentó y aprobó por el Comité Técnico Ético del CEADES y también por el Comité de Bioética del SEDES Chuquisaca.

Aunque no se prevén, la investigadora participante en el estudio registrará, firmará y fechará cualquier dilema ético o enmiendas al protocolo que pudieran surgir en el transcurso del estudio.

Se contó con un formulario de consentimiento informado firmado o con la huella dactilar estampada por el padre, la madre o tutor de cada uno de los participantes menores de 18 años. Los participantes examinados con capacidad de entender el propósito y el contenido del estudio dieron su asentimiento escrito al estudio en el mismo formulario. Aquellas personas que no den su consentimiento serán excluidas del análisis. (*Ver Anexo N° 9*).

III.8.6 Cuestiones adicionales.

- ***Seguimiento y tratamiento de las personas que han dado positivo a la enfermedad de Chagas***

Todos los pacientes mayores de 15 años examinados con un resultado positivo confirmado en el Área Chagas del Laboratorio de Referencia de Chuquisaca, serán referidos a la Plataforma de Atención de Sucre, a fin de que se pueda realizar el tratamiento etiológico, según los criterios utilizados en los protocolos internacionales de tratamiento.

Los pacientes menores de 15 años examinados con un resultado positivo confirmado en el Área Chagas del Laboratorio de Referencia de Chuquisaca, serán referidos al Servicio de Salud de 1º nivel que le corresponda geográficamente a fin de realizar el tratamiento etiológico, según los criterios utilizados en los protocolos del PNCH.

En el caso que una persona resulte negativa al diagnóstico con la dupla inmunocromatográfica, pero se confirme como positiva en laboratorio, se realizará la búsqueda del paciente y se le ofrecerá tratamiento y se lo referirá a la Plataforma.

El tratamiento de primera línea estándar para Chagas es de 5 mg /kg/ día de Benznidazol, divididos en dos dosis diarias durante 60 días, para niños comprendidos entre 1 a 14 años de edad, con una dosis máxima diaria de hasta 300 mg.

- ***Recursos Humanos e instituciones implicadas.***

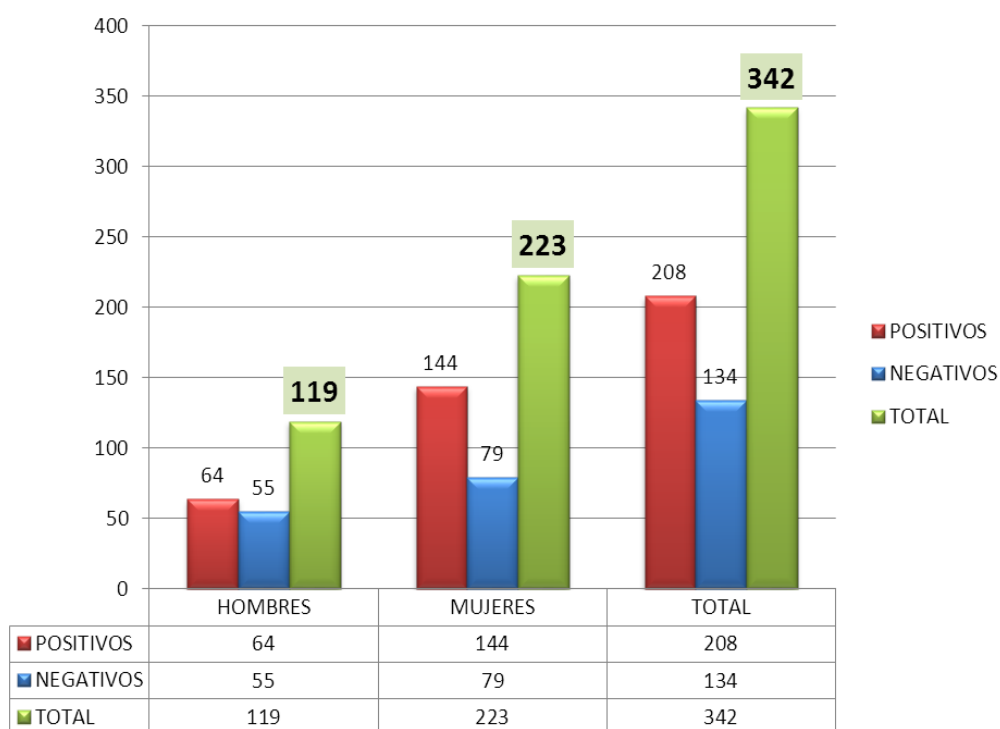
Este estudio es una colaboración de la Fundación Clinic de Barcelona, CEADES y el SEDES Chuquisaca, a través del Programa Departamental de Chagas. El estudio será realizado por la Responsable de Diagnóstico del PDCH-Chuquisaca que en este caso es la misma investigadora y cuya base de trabajo se encuentra en el Área Chagas del Laboratorio de Referencia de Chuquisaca; con la colaboración del equipo de trabajo del área.

CAPITULO IV
RESULTADOS DE
LA INVESTIGACIÓN

IV.1. RESULTADOS

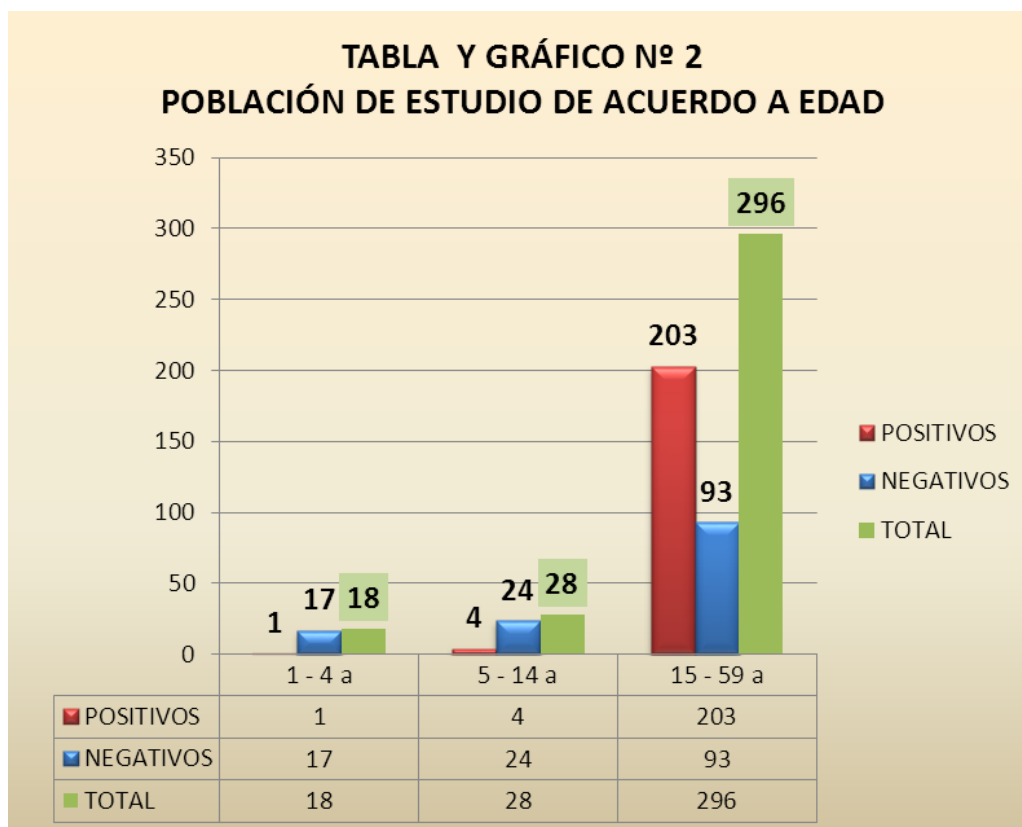
El estudio se realizó en 342 pacientes, comprendidos entre 1 a <60 años de edad que acudieron al LDR, con solicitud médica o personal para diagnóstico de Chagas y que no hubieron realizado tratamiento previo.

TABLA Y GRÁFICO Nº 1
Población de estudio de acuerdo a sexo y resultado para Chagas



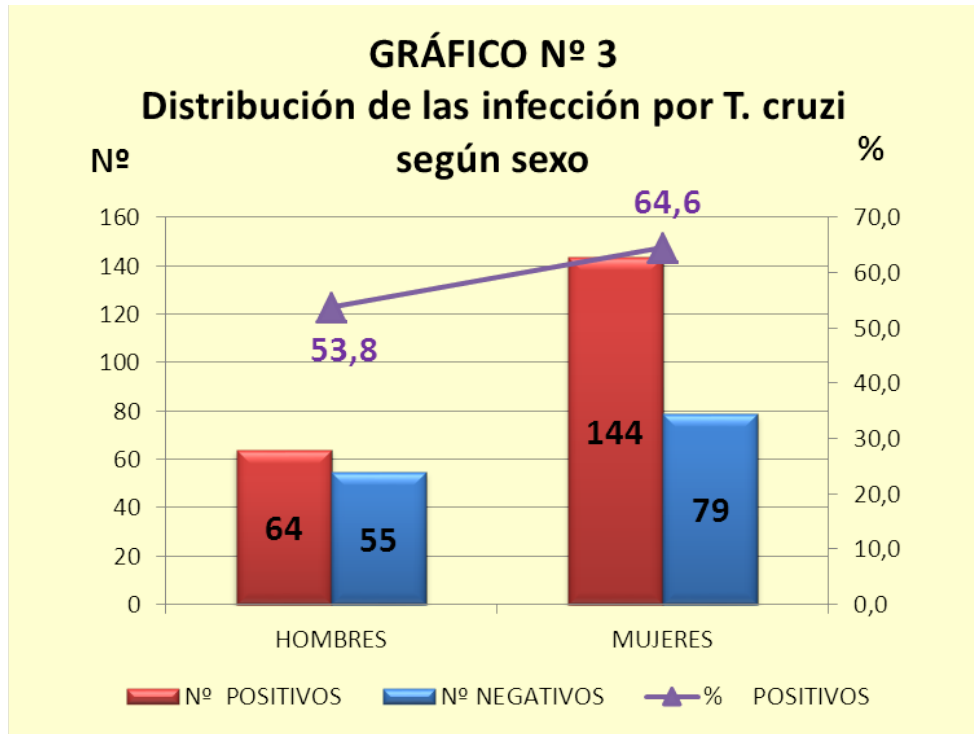
Fuente Propia de Investigación

Interpretación: Se observa la distribución de la población del estudio de acuerdo a sexo y resultado para Chagas. El sexo predominante fue el femenino, con 223 mujeres frente a 119 varones. De igual manera, las mujeres fueron mayoritariamente positivas (n=144) que los hombres (n=64).



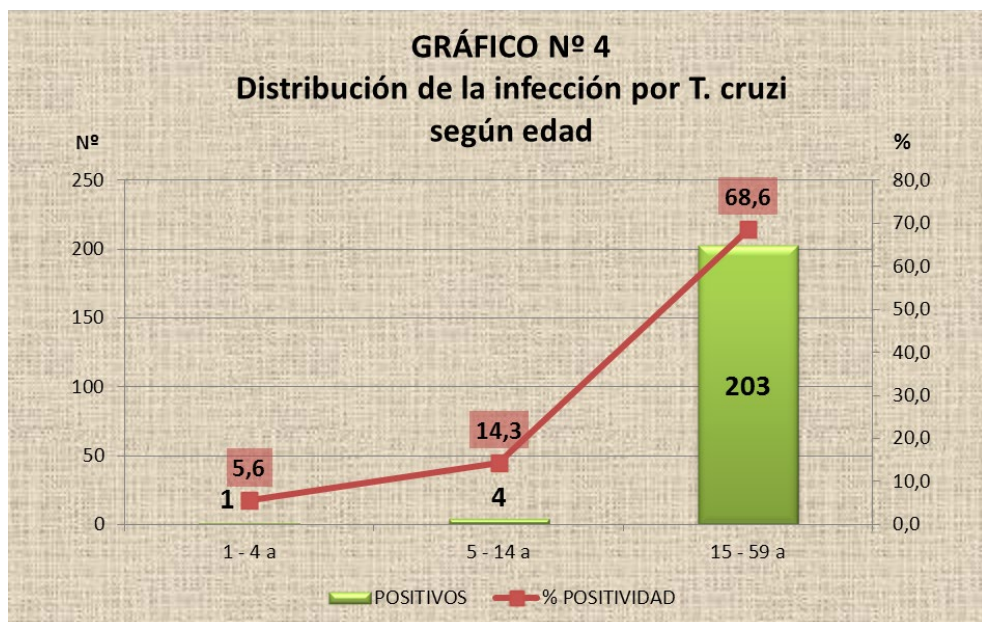
Fuente Propia de Investigación

Interpretación: Nos muestran la distribución de la población de estudio de acuerdo a grupos de edad. Podemos observar que el grupo mayoritario estuvo conformado por los pacientes de 15 a 59 años ($n=296$), en contraposición a los de 1 a 4 años ($n=18$) y de 5 a 14 años ($n=28$), que participaron en menor cantidad. De la misma forma, la mayor cantidad de positivos estuvo concentrada en éste grupo etéreo, con un total de 203 positivos.



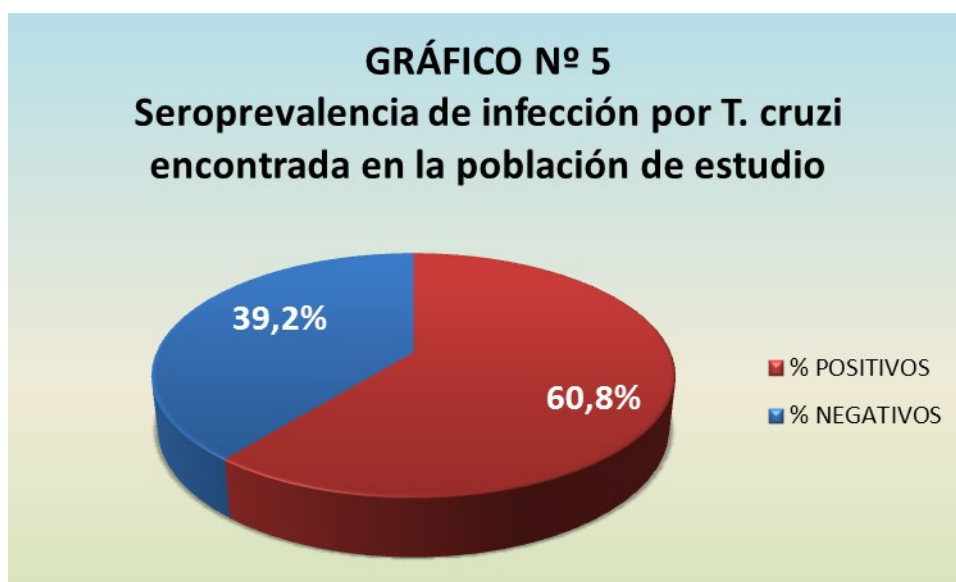
Fuente Propia de Investigación

Interpretación: Observamos la distribución de la Infección por *Trypanosoma cruzi*, de acuerdo a sexo, encontrando que el grupo de género más afectado es el femenino con un 64,6% de positividad, frente al grupo masculino con un 53,8%.



Fuente Propia de Investigación

Interpretación: Observamos la distribución de la Infección por *Trypanosoma cruzi*, de acuerdo a edad, encontrando que el grupo etáreo que presenta mayor porcentaje de positividad es el 15 a 59 años, con un 68,6%.



Fuente Propia de Investigación

Interpretación: Por su parte nos muestra la Seroprevalencia encontrada en la población estudiada, habiéndose encontrado un 60,8% de positividad.

- El cálculo de la sensibilidad, especificidad y valores predictivos de la **dupla inmunocromatográfica (Stat-Pak e InBIOS)** frente a la prueba estándar de referencia (ELISA Recombinante) utilizando sangre total en el ensayo, nos reflejó los siguientes resultados:

TABLA N° 3
CÁLCULO DE SENSIBILIDAD, ESPECIFICIDAD Y VALORES PREDICTIVOS
DE LA DUPLA INMUNOCROMATOGRÁFICA (STAT-PAK/INBIOS) vs. ELISA
RECOMBINANTE (GOLD ESTÁNDAR)

Nivel de confianza: 95,0%

Dupla Stat-Pak/InBios	ELISA Recombinante		
	Enfermos	Sanos	Total
Positivo	208	1	209
Negativo	0	133	133
Total	208	134	342

	Valor	IC (95%)	
Sensibilidad (%)	100,00	99,76	100,00
Especificidad (%)	99,25	98,87	99,64
Valor predictivo + (%)	99,52	99,28	99,77
Valor predictivo - (%)	100,00	99,62	100,00
Prevalencia (%)	60,82	60,64	61,00

La Sensibilidad (S) encontrada fue del 100%, lo cual nos indica que la probabilidad de que un paciente detectado como positivo con la dupla inmunocromatográfica se encuentra entre el 99,76 y 100%, teniendo 95% de intervalo de confianza.

La Especificidad (E) fue del 99,25%, que demuestra que si el resultado es negativo se tiene la probabilidad de que le individuo esté realmente sano entre el 98,87 y el 99,64%, con un 95% de confianza.

El Valor Predictivo Positivo (VPP) obtenido fue del 99,52%. Esto nos demuestra que con la dupla estudiada, el intervalo de pacientes comprendidos entre el 99,28 y 99,77%, con una prueba positiva, tienen la enfermedad, con una confianza del 95%.

El valor Predictivo Negativo (VPN) fue del 100%, indicando que con la dupla estudiada, los pacientes con una prueba negativa están libres de la enfermedad en un intervalo comprendido entre el 99,62 y el 100%.

- Así mismo, se calculó la sensibilidad, especificidad y valores predictivos de la **dupla convencional (HAI y ELISA)** frente a la prueba estándar de referencia (ELISA Recombinante), nos reflejó los siguientes resultados:

TABLA N° 4
CÁLCULO DE SENSIBILIDAD, ESPECIFICIDAD Y VALORES PREDICTIVOS DE LA DUPLA CONVENCIONAL (HAI/ELISA) vs. ELISA RECOMBINANTE (GOLD ESTÁNDAR)

Nivel de confianza: 95,0%

Dupla HAI/ELISA	ELISA Recombinante		Total
	Enfermos	Sanos	
Positivo	208	1	209
Negativo	0	133	133
Total	208	134	342

	Valor	IC (95%)	
Sensibilidad (%)	100,00	99,76	100,00
Especificidad (%)	99,25	98,87	99,64
Valor predictivo + (%)	99,52	99,28	99,77
Valor predictivo - (%)	100,00	99,62	100,00
Prevalencia (%)	60,82	60,64	61,00

La Sensibilidad (S) encontrada fue del 100%, lo cual nos indica que la probabilidad de que un paciente detectado como positivo con la dupla convencional se encuentra entre el 99,76 y 100%, teniendo 95% de intervalo de confianza.

La Especificidad (E) fue del 99,25%, que demuestra que si el resultado es negativo se tiene la probabilidad de que le individuo esté realmente sano entre el 98,87 y el 99,64%, con un 95% de confianza.

El Valor Predictivo Positivo (VPP) obtenido fue del 99,52%. Esto nos demuestra que con la dupla convencional, el intervalo de pacientes comprendidos entre el 99,28 y 99,77%, con una prueba positiva, tienen la enfermedad, con una confianza del 95%.

El valor Predictivo Negativo (VPN) fue del 100%, indicando que con la dupla convencional, los pacientes con una prueba negativa están libres de la enfermedad en un intervalo comprendido entre el 99,62 y el 100%.

- El estudio de la sensibilidad, especificidad y valores predictivos de **cada una de las pruebas diagnósticas** utilizadas actualmente en los protocolos convencionales (Stat-Pak, HAI, ELISA lisado), frente a la prueba estándar de referencia (ELISA Recombinante), nos mostró los siguientes resultados:

a. STAT-PAK

TABLA N° 5
CÁLCULO DE SENSIBILIDAD, ESPECIFICIDAD Y VALORES PREDICTIVOS DE LA PRUEBA INMUNOCROMATOGRÁFICA STAT-PAK vs. ELISA RECOMBINANTE (GOLD ESTÁNDAR)

Nivel de confianza: 95,0%

Stat-Pak	ELISA Recombinante		Total
	Enfermos	Sanos	
Positivo	208	1	209
Negativo	0	133	133
Total	208	134	342

	Valor	IC (95%)	
Sensibilidad (%)	100,00	99,76	100.00
Especificidad (%)	99,25	98,87	99,64
Valor predictivo + (%)	99,52	99,28	99,77
Valor predictivo - (%)	100.00	99,62	100.00
Prevalencia (%)	60,82	60,64	61,00

La Sensibilidad (S) encontrada fue del 100%, lo cual nos indica que la probabilidad de que un paciente detectado como positivo con la prueba inmunocromatográfica Stat-Pak se encuentra entre el 99,76 y 100%, teniendo 95% de intervalo de confianza.

La Especificidad (E) fue del 99,25%, que demuestra que si el resultado es negativo se tiene la probabilidad de que el individuo esté realmente sano entre el 98,87 y el 99,64%, con un 95% de confianza.

El Valor Predictivo Positivo (VPP) obtenido fue del 99,52%. Esto nos demuestra que con la prueba inmunocromatográfica Stat-Pak, el intervalo de pacientes comprendidos entre el 99,28 y 99,77%, con una prueba positiva, tienen la enfermedad, con una confianza del 95%.

El valor Predictivo Negativo (VPN) fue del 100%, indicando que con la prueba inmunocromatográfica Stat-Pak, los pacientes con una prueba negativa están libres de la enfermedad en un intervalo comprendido entre el 99,62 y el 100%.

b. INBIOS

TABLA N° 6
CÁLCULO DE SENSIBILIDAD, ESPECIFICIDAD Y VALORES PREDICTIVOS
DE LA PRUEBA INMUNOCROMATOGRÁFICA INBIOS vs. ELISA
RECOMBINANTE (GOLD ESTÁNDAR)

Nivel de confianza: 95,0%

InBios	ELISA Recombinante		
	Enfermos	Sanos	Total
Positivo	208	1	209
Negativo	0	133	133
Total	208	134	342

	Valor	IC (95%)	
Sensibilidad (%)	100,00	99,76	100,00
Especificidad (%)	99,25	98,87	99,64
Valor predictivo + (%)	99,52	99,28	99,77
Valor predictivo - (%)	100,00	99,62	100,00
Prevalencia (%)	60,82	60,64	61,00

La Sensibilidad (S) encontrada fue del 100%, lo cual nos indica que la probabilidad de que un paciente detectado como positivo con la prueba inmunocromatográfica InBios se encuentra entre el 99,76 y 100%, teniendo 95% de intervalo de confianza.

La Especificidad (E) fue del 99,25%, que demuestra que si el resultado es negativo se tiene la probabilidad de que el individuo esté realmente sano entre el 98,87 y el 99,64%, con un 95% de confianza.

El Valor Predictivo Positivo (VPP) obtenido fue del 99,52%. Esto nos demuestra que con la prueba inmunocromatográfica InBios, el intervalo de pacientes comprendidos entre el 99,28 y 99,77%, con una prueba positiva, tienen la enfermedad, con una confianza del 95%.

El valor Predictivo Negativo (VPN) fue del 100%, indicando que con la prueba inmunocromatográfica InBios, los pacientes con una prueba negativa están libres de la enfermedad en un intervalo comprendido entre el 99,62 y el 100%.

c. HEMAGLUTINACIÓN INDIRECTA (HAI)

TABLA N° 7
CÁLCULO DE SENSIBILIDAD, ESPECIFICIDAD Y VALORES PREDICTIVOS DE LA PRUEBA HEMAGLUTINACIÓN INDIRECTA (HAI) vs. ELISA RECOMBINANTE (GOLD ESTÁNDAR)

Nivel de confianza: 95,0%

HAI	ELISA Recombinante		
	Enfermos	Sanos	Total
Positivo	206	1	207
Negativo	2	133	135
Total	208	134	342

	Valor	IC (95%)	
Sensibilidad (%)	99,04	98,79	99,29
Especificidad (%)	99,25	98,87	99,64
Valor predictivo + (%)	99,52	99,28	99,77
Valor predictivo - (%)	98,52	98,14	98,90
Prevalencia (%)	60,82	60,64	61,00

La Sensibilidad (S) encontrada fue del 99,04%, lo cual nos indica que la probabilidad de que un paciente detectado como positivo con la prueba HAI, se encuentra entre el 98,79 y 99,29%, teniendo 95% de intervalo de confianza.

La Especificidad (E) fue del 99,25%, que demuestra que si el resultado es negativo se tiene la probabilidad de que el individuo esté realmente sano entre el 98,87 y el 99,64%, con un 95% de confianza.

El Valor Predictivo Positivo (VPP) obtenido fue del 99,52%. Esto nos demuestra que con la prueba HAI, el intervalo de pacientes comprendidos entre el 99,27 y 99,76%, con una prueba positiva, tienen la enfermedad, con una confianza del 95%.

El valor Predictivo Negativo (VPN) fue del 98,52%, indicando que con la prueba HAI, los pacientes con una prueba negativa están libres de la enfermedad en un intervalo comprendido entre el 98,14 y el 98,90%.

d. ELISA LISADO

TABLA N° 8
CÁLCULO DE SENSIBILIDAD, ESPECIFICIDAD Y VALORES PREDICTIVOS DEL
ENSAYO INMUNOENZIMÁTICO (ELISA Lisado) vs. ELISA RECOMBINANTE
(GOLD ESTÁNDAR)

Nivel de confianza: 95,0%

ELISA Lisado	ELISA Recombinante		Total
	Enfermos	Sanos	
Positivo	208	1	209
Negativo	0	133	133
Total	208	134	342

	Valor	IC (95%)	
Sensibilidad (%)	100,00	99,76	100,00
Especificidad (%)	99,25	98,87	99,64
Valor predictivo + (%)	99,52	99,28	99,77
Valor predictivo - (%)	100,00	99,62	100,00
Prevalencia (%)	60,82	60,64	61,00

La Sensibilidad (S) encontrada fue del 100%, lo cual nos indica que la probabilidad de que un paciente detectado como positivo con la prueba del ELISA LISADO, se encuentra entre el 99,76 y 100%, teniendo 95% de intervalo de confianza.

La Especificidad (E) fue del 99,25%, que demuestra que si el resultado es negativo se tiene la probabilidad de que le individuo esté realmente sano entre el 98,87 y el 99,64%, con un 95% de confianza.

El Valor Predictivo Positivo (VPP) obtenido fue del 99,52%. Esto nos demuestra que con la prueba del ELISA LISADO, el intervalo de pacientes comprendidos entre el 99,28 y 99,77%, con una prueba positiva, tienen la enfermedad, con una confianza del 95%.

El valor Predictivo Negativo (VPN) fue del 100%, indicando que con la prueba del ELISA LISADO, los pacientes con una prueba negativa están libres de la enfermedad en un intervalo comprendido entre el 99,62 y el 100%.

- La evaluación de la **Concordancia** de la conclusión diagnóstica obtenida por la **dupla inmunocromatográfica (STAT-PAK/INBIOS)** en relación a la serología convencional (HAI/ELISA) y a la prueba estándar de referencia (ELISA Recombinante), mostraron los siguientes resultados:

a. DUPLA INMUNOCROMATOGRÁFICA (STAT-PAK/INBIOS)

**TABLA N° 9
CÁLCULO DE CONCORDANCIA E INDICE KAPPA DE LA DUPLA
INMUNOCROMATOGRÁFICA (STAT-PAK/INBIOS) vs. ELISA RECOMBINANTE**

Nivel de confianza: 95,0%
Número de categorías: 2

Dupla Stat-Pak/InBios	ELISA Recombinante	
	Positivo	Negativo
Positivo	208	1
Negativo	0	133

Acuerdo observado: 0,9971
Acuerdo esperado: 0,5240

kappa	EE	IC (95,0%)	
0,9939	0,0061	0,9818	1,0000

Kappa mínimo: -0,0015
Kappa máximo: 0,9942

Prueba de significación Estadístico Z	Valor p
18,3800	0,0000

El índice kappa para la dupla inmunocromatográfica propuesta (Stat-Pak/InBios) fue 0.99, es decir que su grado de concordancia con respecto a la prueba de referencia (ELISA Recombinante), fue excelente u óptimo.

b. DUPLA CONVENCIONAL (HAI / ELISA)

**TABLA N° 10
CÁLCULO DE CONCORDANCIA E INDICE KAPPA DE LA DUPLA
CONVENCIONAL (HAI/ELISA) vs. ELISA RECOMBINANTE**

Nivel de confianza: 95,0%
Número de categorías: 2

Dupla HAI/ELISA	ELISA Recombinante	
	Positivo	Negativo
Positivo	208	1
Negativo	0	133
	Acuerdo observado:	0,9971
	Acuerdo esperado:	0,5240

kappa	EE	IC (95,0%)	
0,9939	0,0061	0,9818	1,0000

Kappa mínimo: -0,0015
Kappa máximo: 0,9942

Prueba de significación Estadístico Z	Valor p
18,3800	0,0000

El índice kappa para la dupla convencional (HAI/ELISA) fue 0.99, es decir que su grado de concordancia con respecto a la prueba de referencia (ELISA Recombinante), fue también óptimo.

c. DUPLA INMUNOCROMATOGRÁFICA vs DUPLA CONVENCIONAL (HAI/ELISA)

**TABLA N° 11
CÁLCULO DE CONCORDANCIA E INDICE KAPPA DE LA DUPLA INMUNOCROMATOGRÁFICA (STAT-PAK/INBIOS) vs. LA DUPLA CONVENCIONAL (HAI/ELISA)**

Nivel de confianza: 95,0%
Número de categorías: 3

Dupla Stat-Pak/InBios	Dupla Convencional (HAI/ELISA)		
	Positivo	Negativo	Indeterminado
Positivo	206	1	2
Negativo	0	131	2
Indeterminado	0	0	0

Acuerdo observado: 0,9854
Acuerdo esperado: 0,5182

kappa	EE	IC (95,0%)	
0,9697	0,0133	0,9436	0,9957

Prueba de significación Estadístico Z	Valor p
18,2652	0,0000

El índice kappa para la dupla inmunocromatográfica propuesta (Stat-Pak/InBios) fue 0.97, es decir que su grado de concordancia con respecto a la metodología convencional (HAI/ELISA), fue excelente.

- Así mismo se midió la **Concordancia** de cada una de las pruebas evaluadas, tanto las propuestas como las convencionales entre sí y respecto a la prueba estándar de referencia, obteniéndose los siguientes resultados:

a. STAT-PAK vs INBIOS

**TABLA Nº 12
CÁLCULO DE CONCORDANCIA E INDICE KAPPA DE LAS PRUEBAS
INMUNOCROMATOGRÁFICAS INBIOS vs. STAT-PAK**

Nivel de confianza: 95,0%
Número de categorías: 2

InBios	Stat-Pak		
	Positivo	Negativo	
Positivo	209	0	
Negativo	0	133	
Acuerdo observado:	1,0000		
Acuerdo esperado:	0,5247		
kappa	EE	IC (95,0%)	
1,0000	0,0000	1,0000	1,0000
	Kappa mínimo:	0,0000	
	Kappa máximo:	1,0000	
Prueba de significación Estadístico Z	Valor p		
18,4932	0,0000		

El índice kappa para la prueba inmunocromatográfica InBios, fue 1.0, es decir que su grado de concordancia con respecto a la prueba Stat-Pak, fue perfecto.

b. STAT-PAK vs ELISA Recombinante

**TABLA N° 13
CÁLCULO DE CONCORDANCIA E INDICE KAPPA DE LA PRUEBA
STAT-PAK vs. ELISA RECOMBINANTE**

Nivel de confianza: 95,0%
Número de categorías: 2

Stat-Pak	ELISA Recombinante		
	Positivo	Negativo	
Positivo	208	1	
Negativo	0	133	
	Acuerdo observado:	0,9971	
	Acuerdo esperado:	0,5240	
kappa	EE	IC (95,0%)	
0,9939	0,0061	0,9818	1,0000
	Kappa mínimo:	-0,0015	
	Kappa máximo:	0,9942	
Prueba de significación Estadístico Z	Valor p		
18,3800	0,0000		

El índice kappa para la prueba inmunocromatográfica Stat-Pak fue 0.99, es decir que su grado de concordancia con respecto a la prueba de referencia (ELISA Recombinante), fue excelente.

c. INBIOS vs ELISA Recombinante

**TABLA N° 14
CÁLCULO DE CONCORDANCIA E INDICE KAPPA DE LA PRUEBA
INBIOS vs. ELISA RECOMBINANTE**

Nivel de confianza: 95,0%
Número de categorías: 2

InBios	ELISA Recombinante		
	Positivo	Negativo	
Positivo	208	1	
Negativo	0	133	
Acuerdo observado:		0,9971	
Acuerdo esperado:		0,5240	
kappa	EE	IC (95,0%)	
0,9939	0,0061	0,9818	1,0000
Kappa mínimo:		-0,0015	
Kappa máximo:		0,9942	
Prueba de significación Estadístico Z	Valor p		
18,3800	0,0000		

El índice kappa para la prueba inmunocromatográfica InBios fue 0.99, es decir que su grado de concordancia con respecto a la prueba de referencia (ELISA Recombinante), fue óptimo.

d. HAI vs ELISA Lisado

**TABLA N° 15
CÁLCULO DE CONCORDANCIA E INDICE KAPPA DE LA PRUEBA DE
HEMAGLUTINACIÓN INDIRECTA (HAI) vs. ELISA LISADO**

Nivel de confianza: 95,0%
Número de categorías: 2

HAI	ELISA Lisado		
	Positivo	Negativo	
Positivo	206	3	
Negativo	1	132	
Acuerdo observado:		0,9883	
Acuerdo esperado:		0,5234	
kappa	EE	IC (95,0%)	
0,9755	0,0122	0,9516	0,9994
Kappa mínimo:		-0,0059	
Kappa máximo:		0,9766	
Prueba de significación Estadístico Z		Valor p	
18,0408		0,0000	

El índice kappa para la prueba HAI fue 0.97, es decir que su grado de concordancia con respecto al ELISA Lisado, fue excelente.

e. HAI vs ELISA Recombinante

TABLA N° 16
CÁLCULO DE CONCORDANCIA E INDICE KAPPA DE LA PRUEBA DE
HEMAGLUTINACIÓN INDIRECTA (HAI) vs. ELISA RECOMBINANTE

Nivel de confianza: 95,0%
 Número de categorías: 2

HAI	ELISA Recombinante		
	Positivo	Negativo	
Positivo	206	1	
Negativo	2	133	
Acuerdo observado:		0,9912	
Acuerdo esperado:		0,5228	
kappa	EE	IC (95,0%)	
0,9816	0,0106	0,9609	1,0000
Kappa mínimo:		-0,0044	
Kappa máximo:		0,9825	
Prueba de significación Estadístico Z		Valor p	
18,1537		0,0000	

El índice kappa para la prueba HAI fue 0.98, es decir que su grado de concordancia con respecto a la prueba estándar de referencia, fue excelente.

f. ELISA Lisado vs ELISA Recombinante

**TABLA N° 17
CÁLCULO DE CONCORDANCIA E INDICE KAPPA DE LA PRUEBA ELISA
LISADO vs. ELISA RECOMBINANTE**

Nivel de confianza: 95,0%
Número de categorías: 2

ELISA Lisado	ELISA Recombinante		
	Positivo	Negativo	
Positivo	208	1	
Negativo	0	133	
Acuerdo observado:		0,9971	
Acuerdo esperado:		0,5240	
kappa	EE	IC (95,0%)	
0,9939	0,0061	0,9818	1,0000
Kappa mínimo:		-0,0015	
Kappa máximo:		0,9942	
Prueba de significación Estadístico Z		Valor p	
18,3800		0,0000	

El índice kappa para la prueba ELISA Lisado fue 0.99, es decir que su grado de concordancia con respecto a la prueba estándar de referencia, fue óptimo.

- Finalmente se valoró la **Eficiencia** o Valor Predictivo Global de las duplas inmunocromatográficas propuestas y de las duplas convencionales, obteniéndose los siguientes resultados:

TABLA N° 18
CÁLCULO DE LA EFICIENCIA O ÍNDICE DE VALIDEZ DE LA DUPLA
INMUNOCROMATOGRÁFICA (STAT-PAK/INBIOS) vs. ELISA RECOMBINANTE
(GOLD ESTÁNDAR)

Nivel de confianza: 95,0%

Dupla Stat-Pak/InBios	ELISA Recombinante		Total
	Enfermos	Sanos	
Positivo	208	1	209
Negativo	0	133	133
Total	208	134	342

	Valor	IC (95%)	
Índice de Validez (%)	99,71	98,99	100,00
Prevalencia (%)	60,82	55,50	66,14
Índice de Youden	0,99	0,98	1,01

La Eficiencia de la dupla inmunocromatográfica (Stat-Pak/InBios) fue del 99,71%, lo que indica que la probabilidad de que un individuo sea clasificado correctamente por esta dupla diagnóstica se encuentra entre el 98,99 y el 100%.

TABLA N° 19
CÁLCULO DE LA EFICIENCIA O ÍNDICE DE VALIDEZ DE LA DUPLA
CONVENCIONAL (HAI/ELISA) vs. ELISA RECOMBINANTE (GOLD ESTÁNDAR)

Nivel de confianza: 95,0%

Dupla HAI/ELISA	ELISA Recombinante		Total
	Enfermos	Sanos	
Positivo	208	1	209
Negativo	0	133	133
Total	208	134	342

	Valor	IC (95%)	
Índice de Validez (%)	99,71	98,99	100,00
Prevalencia (%)	60,82	55,50	66,14

Índice de Youden	0,99	0,98	1,01
------------------	------	------	------

La Eficiencia de la dupla serológica convencional (HAI/ELISA) fue del 99,71%, lo que indica que la probabilidad de que un individuo sea clasificado correctamente por esta dupla diagnóstica se encuentra entre el 98,99 y el 100%.

IV.2. DISCUSIÓN

La mayoría de los municipios endémicos del Departamento de Chuquisaca y de Bolivia presentan problemas de accesibilidad geográfica a los servicios de laboratorio y una alta prevalencia de *T. cruzi* en su población. En general, los laboratorios para el diagnóstico de las enfermedades infecciosas son pequeños, tienen pocos recursos y realizar un número limitado de pruebas por día. Estos laboratorios, sin embargo, están obligados a incluir el diagnóstico de Chagas en la población que demanda este servicio.

Hay, por lo tanto, la necesidad de un diagnóstico rápido y confiable para la enfermedad de Chagas para ser utilizado en estas circunstancias, y tal prueba debe ser disponible comercialmente para su uso inmediato. Además, la prueba debe tener sensibilidad y alta especificidad y validarse con sueros locales para poder diagnosticar a los individuos infectados con las cepas circulantes de *T. cruzi* en estas regiones. Finalmente, tal diagnóstico debe ser adecuado para su uso con un pequeño número de muestras por día.

Las pruebas rápidas de diagnóstico (RTD) proporcionan una oportunidad valiosa para dar resultados rápidos, confiables y precisos si la prueba es sensible y específica. Debido a su practicidad, en los últimos años ha aumentado el uso de estas pruebas para el diagnóstico de enfermedades infecciosas prevalentes en nuestras regiones, tal es el caso de la malaria y el dengue. Así mismo, se han realizado algunos estudios en referencia a la utilización de pruebas rápidas para el tamizaje de pacientes con Chagas, tanto en zonas endémicas como no endémicas, probando sangre entera, suero y/o plasma ^{10, 13, 15, 33, 34, 38, 39}, habiéndose obtenido resultados aceptables, la incorporación dentro de los protocolos de diagnóstico en nuestro país, ha brindado practicidad al descarte serológico tanto en bancos de sangre como en laboratorios de diagnóstico clínico. Sin embargo, los resultados deben confirmarse en laboratorio antes de emitirse una conclusión diagnóstica final, lo que añade una espera de tiempo importante

antes del inicio del tratamiento etiológico, lo que conlleva a su vez, a la dificultad en la adhesión de los pacientes positivos.

Por esta razón, el planteamiento del presente estudio, buscó evaluar una dupla inmunocromatográfica formada por dos pruebas rápidas validadas por separado en otras investigaciones, con la finalidad de probar el rendimiento de ambas en paralelo frente a la serología convencional comúnmente utilizada en el diagnóstico de rutina.

La fase operativa y analítica de la investigación se desarrolló entre los meses de marzo a julio de 2014. Participaron 342 pacientes de 1 a 59 años de edad que acudieron por solicitud médica o por demanda al Laboratorio Departamental de Referencia de Chagas del SEDES Chuquisaca y a la Plataforma de atención integral al paciente chagásico de la ciudad de Sucre.

El análisis de los resultados se realizó en cumplimiento de los objetivos planteados en el estudio, con el fin de evaluar la aplicación en paralelo de las pruebas inmunocromatográficas Stat-Pak e InBios como una nueva alternativa propuesta a ser utilizada en comunidades sin acceso a laboratorio, en lugar de la dupla convencional conformada por las pruebas HAI y ELISA, habitualmente aplicadas para el diagnóstico de Chagas y que requiere necesariamente de la utilización de recursos de laboratorio, mayor logística y tiempo para la entrega de los resultados, antes del inicio de tratamiento.

Se trabajó con la totalidad de la población, considerando los criterios de inclusión y exclusión planteados, obteniéndose una seroprevalencia del 60,8%. Sin embargo es necesario conocer que la mayor carga poblacional estuvo en los pacientes mayores de 15 años, por lo cual el resultado de prevalencia es elevado. Así mismo, el género con mayor frecuencia de positividad estuvo en las mujeres (64,6%). Empero también la población total estuvo conformada por el 65,2% de mujeres que acudieron al

laboratorio por un diagnóstico de Chagas (n = 342; mujeres: 223, varones: 119).

En cuanto a la evaluación de la sensibilidad (S) de las pruebas propuestas como dupla diagnóstica, se obtuvo un 100%, al igual que la dupla convencional. El análisis de la especificidad tanto de la dupla inmunocromatográfica como de la convencional, fue del 99,25%.

De la misma manera, los valores predictivos positivos (99,52%) y negativos (100%), fueron los mismos tanto para la dupla inmunocromatográfica como para la dupla convencional:

CUADRO N° 1

CUADRO COMPARATIVO DE PARÁMETROS EVALUADORES DE DIAGNÓSTICO
POR DUPLAS DIAGNÓSTICAS

	S (%)	E (%)	VPP (%)	VPN (%)	ED (%)	(1)	(2)
Stat-Pak / InBios	100,00	99,25	99,52	100,00	99,71	0,9939	1,0000
HAI / ELISA Lisado	100,00	99,25	99,52	100,00	99,71	0,9939	0,9755

S = Sensibilidad

VPP = Valor Predictivo Positivo

ED = Eficiencia Diagnóstica
 \bar{k}

(1) = Índice Kappa dupla vs
estandar

E = Especificidad

VPN = Valor Predictivo Negativo

= Índice Kappa

(2) = Índice Kappa entre si

Para cada una de las pruebas inmunocromatográficas y convencionales también fueron calculados los mismos parámetros de sensibilidad, especificidad y valores predictivos, con la finalidad de comparar todas y cada una de las pruebas del estudio. Los resultados obtenidos pueden observarse en el siguiente cuadro comparativo:

CUADRO N° 2
CUADRO COMPARATIVO DE PARÁMETROS EVALUADORES DE DIAGNÓSTICO
POR PRUEBAS INDIVIDUALES

	S (%)	E (%)	VPP (%)	VPN (%)	ED (%)	
Stat-Pak	100,00	99,25	99,52	100,00	99,71	0,9939
InBios	100,00	99,25	99,52	100,00	99,71	0,9939
HAI	99,04	99,25	99,52	98,52	99,12	0,9816
ELISA Lisado	100,00	99,25	99,52	100,00	99,71	0,9939

S = Sensibilidad

E = Especificidad

VPP = Valor Predictivo Positivo

VPN = Valor Predictivo Negativo

ED = Eficiencia Diagnóstica

= Índice Kappa

Como se observa, los valores obtenidos en el análisis de cada una de las pruebas, son bastante altos y homogéneos en cuanto a la capacidad de obtener resultados positivos en los pacientes verdaderamente positivos a la infección por *Trypanosoma cruzi* y así mismo, obtener resultados negativos en los pacientes realmente sanos o no infectados.

En el estudio de Arrieta y colaboradores en 2004³⁵, desarrollado en San Luis, Argentina, para la evaluación de una metodología de tamizaje en la enfermedad de Chagas, utilizando sangre capilar y recolectadas sobre amortiguador de glicerina, se procesaron por HAI cuantitativa y ELISA, obteniendo una sensibilidad, especificidad y valores predictivos positivos y negativos de 98,03; 92,96; 78,12 y 99,46%, respectivamente. La dupla de pruebas serológicas (HAI / ELISA) para determinar anticuerpos anti-*T. cruzi* demostró ser apta como técnica de tamizaje en la sangre conservada en amortiguador de glicerina y a temperatura ambiente, mostrando sensibilidad ideal y especificidad adecuada.

En el presente estudio, tanto la dupla convencional, como la dupla propuesta, obtuvieron el 100% de sensibilidad y el 99,25% de especificidad respectivamente. Sus VPP fueron de 99,52% y los VPN del 100% para

ambas duplas. Se comparó el rendimiento de la prueba inmunocromatográfica rápida Chagas Stat-Pak e InBios, con un análisis inmunoenzimático de 3^o generación (ELISA Recombinante) para el serodiagnóstico de la enfermedad de Chagas. Existió un acuerdo del 100% entre las dos pruebas.

Tanto Chagas Stat-Pak, como InBios demostraron 100% y 99,25% de sensibilidad y especificidad, respectivamente y por separado. Evaluadas en forma conjunta, presentan exactamente los mismos valores. Debido a que la sensibilidad de esta metodología elegida es igual a 100% es poco probable que pase por alto a los individuos infectados, o sea, no se pierdan infectados verdaderos, es menor el número de falsos negativo, aunque si es posible encontrar falsos positivo.

La especificidad de 99,25% garantiza que rara vez se clasificará erróneamente a los individuos sanos como infectados. A mayor especificidad, es menor el número de falsos positivos y no es posible encontrar falsos negativos. La probabilidad de acierto en términos de enfermedad, o sea el VPP (99,52%), indica que de cada 100 rotulados infectados chagásicos, menos de 1 en la realidad no lo es. Mientras que, en términos de salud, el VPN (100%) revela la posibilidad de que cada 100 individuos estudiados y clasificados como seronegativos, ninguno sea seropositivo. Dicho de otro modo, la metodología estudiada da la seguridad de que el resultado negativo descarte la enfermedad.

Así mismo, el análisis de la concordancia con respecto a la prueba estándar de referencia (ELISA Recombinante), a través del índice kappa, nos muestra que tanto las pruebas inmunocromatográficas, como las convencionales, en forma individual, presentan excelentes resultados ($k = 0,99$ para Stat-Pak, InBios, ELISA Lisado y $0,98$ para HAI), considerando que de acuerdo a la escala de interpretación de Landis y Koch se considera como aceptable un valor mayor a $0,40$ y excelentes los valores superiores a $0,75$. Para que una RDT se considere una medida de buena fiabilidad, el coeficiente Kappa debe ser superior a $0,80$.

El análisis de la concordancia de la conclusión diagnóstica obtenida por la dupla inmunocromatográfica (Stat-Pak/InBios) en relación a la serología convencional (HAI/ELISA) habitualmente usada, mostro un kappa de 0,9697 con un acuerdo observado de 0,9854 (98.54%) que resulta bastante elevado. La dupla inmunocromatográfica propuesta en relación al ELISA Recombinante, mostró un kappa de 0,9939; con un acuerdo observado de 0,9971 (99,71%). Lo que significa que la concordancia es óptima frente a la prueba estándar de referencia.

Siendo la Eficiencia, la probabilidad de que un individuo sea clasificado correctamente por la prueba, podemos observar que todas y cada una de las pruebas evaluadas presentan una eficiencia mayor al 99%. Si hacemos una valoración acerca de dupla inmunocromatográfica propuesta y de la dupla convencional, podemos ver que en ambos casos éste índice fue de 99,71%; valor que es corroborado por un índice de Youden de 0,99. Éste parámetro refleja la diferencia entre la tasa de verdaderos positivos y la de falsos positivos. Un buen test debe tener alta esta diferencia. Teóricamente es igual a 1 sólo cuando la prueba diagnóstica es perfecta, o sea, cuando $S + E = 2$, de modo que también puede decirse que cuánto más cercano a 1, mejor es la prueba diagnóstica que se está evaluando.

Estudios realizados con Chagas Stat-Pak publicados recientemente sugieren que esta prueba satisface todos estos requisitos. El estudio de Ponce y colaboradores ¹¹, comparó el rendimiento de la prueba inmunocromatográfica rápida Chagas Stat-Pak con un análisis estándar inmunoenzimático (ELISA) en el serodiagnóstico de la enfermedad de Chagas en América Central, demostrando el 99.6% y 99,9% sensibilidad y especificidad, respectivamente. Hubo acuerdo perfecto entre ambas pruebas (Stat-Pak y ELISA) con todas las muestras incluidas en el estudio. Estos resultados permitieron recomendar Chagas Stat-Pak como una segunda prueba en bancos de sangre y una sola prueba en casos de emergencia, así como en estudios sero-epidemiológicos, además de realizarse sin la necesidad de habilidades especiales.

Roddy et al en 2008 ¹³, a través de un estudio transversal midió la sensibilidad y especificidad de la Chagas Stat-Pak con sangre entera, usando análisis serológicos convencionales para la comparación, encontrando una alta especificidad (99%) pero una sensibilidad relativamente baja (93,4%). La fiabilidad inter-observador fue excelente (kappa 0,99), y el criterio de facilidad de uso cuantificado sugirió que la RDT es fácil de realizar. A pesar de los atributos de Chagas Stat-Pak, este estudio concluyó que no es una prueba de diagnóstico ideal para la población investigada debido a su relativamente baja sensibilidad y alto costo.

Sánchez et al ³⁶, con el apoyo de 11 laboratorios nacionales de referencia de diferentes áreas geográficas, evaluaron las actuaciones de pruebas serológicas de diagnóstico rápido comercialmente disponibles. Midieron la sensibilidad, especificidad y concordancia de cada RDT, así como su facilidad de uso. No observaron diferencias significativas en el desempeño de las RDT en las diferentes regiones. En general, los resultados fueron inferiores a los revelados por los fabricantes. Sin embargo, de las 11 pruebas evaluadas, sólo el Chagas Stat-Pak, corresponde a nuestro estudio, ya que InBios, no fue considerada. En el mencionado estudio, la sensibilidad y especificidad de la prueba de Chagas Stat-Pak usando muestras de suero fueron 87% y 95%, respectivamente, que es menos que los reportados en 6 estudios independientes realizados entre 2003 y 2010 ^{13, 10, 33}.

Por otra parte, por Reithinger et al ³⁴ en el 2010, reportaron datos del rendimiento de esta prueba rápida (Chagas Stat-Pak) de 93,5% sensibilidad y 95,2% especificidad, cercanos a los datos reportados en otros estudios similares (Lorca et al) ¹⁵.

Como se observa, los resultados obtenidos en nuestra investigación fueron mejores que los encontrados en el estudio realizado por Roddy et al ¹³ en 2008 y Sánchez et al ³⁶ en 2013.

Una posible explicación de las diferencias en las actuaciones de prueba observadas aquí con referencia a otros estudios, puede estar relacionada a la variabilidad antigénica en las diferentes regiones donde se transmite la enfermedad de Chagas. Estas posibles diferencias antigénicas pueden resultar en la producción de algunos anticuerpos que pueden no detectarse igualmente por todas las RTD evaluadas en los otros estudios.

En la investigación realizada por Rojas MG ³⁷, en 2009, para la validación de la Técnica Rápida InBios, en niños menores de 5 años de zonas endémicas de Chuquisaca, se obtuvo una sensibilidad del 97,7% y una especificidad del 99%. El VPP fue de 80,4% y el VPN, de 100%. En este estudio se compararon los valores obtenidos también con el Chagas Stat-Pak, el cual mostró un VPP de 92,3% y un VPN de 99,7%.

Como se puede apreciar, los resultados del presente estudio fueron superiores en todos y cada uno de los parámetros utilizados para la evaluación.

En general, tanto el Chagas Stat-Pak, como el test InBios resultan ventajosos frente a los ensayos convencionales. Las RDT toman menos pasos en su procedimiento y son más fáciles de interpretar. Las RDT se pueden almacenar hasta 30° C, pero los tres ensayos convencionales requieren de refrigeración de 2 a 8° C. Los resultados de las RDT están disponibles a los 15 a 20 minutos después de la extracción de la sangre entera, mientras que para HAI y los ELISA se requieren 3 y 4 h, respectivamente, para completar el procesamiento. Las RDT no requieren materiales adicionales como un espectrofotómetro, micropipetas, incubadora, centrífuga o parafilm que son necesarios para realizar los ensayos convencionales. Además, las RDT tiene la ventaja de dispensar a la muestra de sangre directamente en el dispositivo de prueba, mientras que los ensayos convencionales requieren de una solución tampón para eluir la muestra previamente, o bien de la separación previa del suero.

Sin embargo, los ensayos convencionales tienen algunas ventajas sobre las RDT. La estabilidad del resultado es menos de 30 minutos para las RDT y ELISA, mientras que la constancia de resultados de Chagas HAI es más de 24 horas. En Bolivia, los costos RDT entre 4 y 7 dólares estadounidenses (USD) por cada examen respectivamente. Esto es más caro que los ensayos convencionales, que cuestan menos de 1 USD por prueba. Sin embargo, si sumamos el costo logístico para la realización y posterior devolución de los resultados a las poblaciones alejadas y sin acceso a laboratorio, los costos reales de las pruebas convencionales, podrían ser mayores, sin considerar además la pérdida de la oportunidad de una rápida adhesión al tratamiento por parte del paciente.

CAPITULO V
CONCLUSIONES Y
RECOMENDACIONES

V.1. CONCLUSIONES

Realizada la interpretación de los resultados podemos concluir que la hipótesis de la investigación fue confirmada, debido a que la aplicación de las dos pruebas rápidas en paralelo (Chagas Stat-Pak™ y Test InBios™) en sangre total, mantienen una elevada sensibilidad y especificidad en el diagnóstico serológico de la infección por *Trypanosoma cruzi*, en relación a la dupla convencional (HAI y ELISA).

El análisis comparativo de la sensibilidad, especificidad y valores predictivos de la dupla inmunocromatográfica propuesta (Stat-Pak e InBios) frente a la prueba estándar de referencia (ELISA Recombinante) utilizando sangre total en el ensayo, fue del 100%, 99,25%, 99,52% y 100% respectivamente, lo que significa que con la dupla propuesta es posible detectar a todos los positivos y clasificar como negativos a los individuos que realmente no presentan la enfermedad.

En cuanto a la comparación de la sensibilidad, especificidad y valores predictivos de cada una de las pruebas diagnósticas utilizadas actualmente en los protocolos convencionales (Stat-Pak, HAI, ELISA lisado), frente a la prueba estándar de referencia (ELISA Recombinante), los valores obtenidos fueron de 100%; 99,25%; 99,52% y 100% respectivamente para todas las pruebas excepto para el HAI, cuyos valores obtenidos fueron algo menores en cuanto a la sensibilidad (99,04%) y valor predictivo negativo (98,52%).

El análisis de la concordancia de la conclusión diagnóstica obtenida por la dupla inmunocromatográfica (Stat-Pak/InBios) en relación a la serología convencional (HAI/ELISA) mostró una muy buena concordancia (98,5% acuerdo global), con una estadística kappa sugiriendo excelencia ($k = 0,9697$).

La concordancia de la conclusión diagnóstica de la dupla inmunocromatográfica (Stat-Pak/InBios) en relación a la prueba estándar de referencia (ELISA Recombinante) mostró una excelente concordancia (99,7% acuerdo global), con una estadística kappa de excelencia ($k = 0,9939$).

El grado de concordancia de la prueba inmunocromatográfica InBios con respecto a la prueba Stat-Pak, fue perfecto ($k = 1,0$). Frente a la prueba estándar de referencia fue óptimo (0,99). La concordancia del Stat-Pak frente a la prueba de referencia fue excelente ($k = 0,99$).

La prueba HAI con respecto al ELISA Lisado, obtuvo una concordancia excelente (0,9755). Frente al estándar de referencia fue también excelente ($k = 0,9816$). Así mismo el ELISA Lisado tuvo una concordancia óptima respecto a la prueba estándar de referencia ($k = 0,9939$)

Por otra parte, la Eficiencia o Valor Predictivo Global tanto de la dupla inmunocromatográfica (Stat-Pak/InBios), como de la dupla convencionalmente usada (HAI/ELISA), es la misma, es decir, que el 99,71% de los individuos fueron clasificados correctamente por ambas opciones diagnósticas.

Finalmente, la seroprevalencia encontrada en la población de estudio fue del 60,8%. El género con mayor frecuencia de positividad estuvo en las mujeres (64,6%). Así mismo, el grupo etáreo más afectado fue el comprendido entre los 15 a 59 años de edad (68,6%). Sin embargo la mayor carga poblacional estuvo conformada por mujeres y por los pacientes mayores de 15 años.

Los resultados de esta investigación, validan la posibilidad de utilizar la dupla inmunocromatográfica Stat-Pak e InBios, como herramienta diagnóstica de la enfermedad de Chagas, reduciendo el tiempo y los recursos logísticos empleados para la obtención de los resultados antes del inicio de tratamiento, sobre todo en condiciones en las que se trabaja en terreno y sin acceso a laboratorio.

Teniendo en cuenta las RTD mostraron alta sensibilidad (100%), alta especificidad (99,25%), su facilidad de uso en comparación con los análisis convencionales y su excelente concordancia (99,7% acuerdo global), con una estadística kappa sugiriendo excelencia ($k = 0,9939$), podemos decir que los resultados obtenidos en esta investigación son bastante alentadores para considerar la utilización de esta dupla inmunocromatográfica como una alternativa de diagnóstico confiable en terreno.

V.2. RECOMENDACIONES

De acuerdo a lo observado en el presente estudio, se recomienda:

A nivel del Programa Nacional de Chagas:

- Incluir dentro de los protocolos nacionales de diagnóstico, la utilización en paralelo de la dupla inmunocromatográfica Chagas Stat-Pak™ e InBios™, como alternativa diagnóstica de primera línea en los lugares endémicos y no-endémicos de difícil o carentes de acceso geográfico a laboratorios de 2º nivel.
- Impulsar los trámites necesarios para el registro sanitario y la importación de la prueba inmunocromatográfica InBios™, de manera que pueda ser accesible de manera comercial, para su adquisición por los Gobiernos Municipales de acuerdo a presupuesto incorporado en sus Planes Operativos Anuales.
- Realizar estudios que evalúen costo/beneficio de la utilización de las pruebas rápidas, a fin de corroborar y fortalecer las ventajas encontradas en la presente y en otras investigaciones desarrolladas.
- Buscar nuevas alternativas de importación para el Chagas Stat-Pak™ y los reactivos convencionales, que puedan abaratar sus costos comerciales, aumentando la accesibilidad de las poblaciones en las regiones de alta prevalencia en nuestro país.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Noireau F. *La Enfermedad de Chagas y sus Particularidades Epidemiológicas en Bolivia*. En Alfred, J.; Guillen, G.; Noireau, F.- Chagas: La Enfermedad en Bolivia. Programa para el Control y la Eliminación de la Enfermedad de Chagas en Bolivia 1998-2002. Bolivia, 1999. p. 17-44.
2. IsGlobal.org. *Chagas una enfermedad olvidada*. España; Abril 2013 [actualizado en mayo de 2014; acceso 19 de julio de 2014]. Disponible en: http://www.isglobal.org/en/web/guest/publication/-/asset_publisher/ljGAMKTwu9m4/content/chagas-a-neglected-disease.
3. Programa Nacional de Chagas. Ministerio de Salud del Estado Plurinacional de Bolivia. *Informe Anual Epidemiológico*. La Paz – Bolivia, 2010.
4. Programa Departamental de Chagas. Servicio Departamental de Salud de Chuquisaca. *Informe Anual de Actividades*. Sucre – Bolivia, 2010.
5. Guhl, F. *Memorias del Primer Taller Internacional sobre Control de la Enfermedad de Chagas*. Universidad de los Andes. Bogotá, Colombia. Mayo de 2005; 435.
6. Torrico F, Castro M: *Aspectos Epidemiológicos de la Enfermedad de Chagas. Diagnóstico de Laboratorio. La Enfermedad de Chagas. Control y Manejo*. Manual del Centro Universitario de Medicina Tropical CUMETROP, 3ª ed., Cochabamba-Bolivia, 2002. p. 7-32, 46-59.
7. Programa Departamental de Chagas. Servicio Departamental de Salud de Chuquisaca. *Informe Anual de Actividades*. Sucre, Bolivia, 2011.
8. Ministerio de Salud. *Manual de normas técnicas y operativas para el tamizaje, diagnóstico y tratamiento de la Enfermedad de Chagas Crónica Reciente infantil*. Serie de documentos técnicos normativos. 2º Edición. Publicación 30. La Paz, Bolivia, 2007.
9. Organización Mundial de la Salud. *Control de la Enfermedad de Chagas: Informe del Comité de expertos de la OMS*. Serie de Informes Técnicos de la OMS N° 905. Ginebra, Suiza, 2002.
10. Luquetti AO, Ponce C, et al. *Chagas disease Diagnosis: A Multicentric Evaluation of Chagas Stat-Pak, a Rapid Immunochromatographic Assay*

- with Recombinant Proteins of Trypanosoma cruzi*. Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases. Agosto 2003; Vol 46(4): 265-71.
11. Ponce C., Ponce E., Vinelli E., et al. *Validation of a Rapid and Reliable Test for Diagnosis of Chagas' Disease by Detection of Trypanosoma cruzi-Specific Antibodies in Blood of Donors and Patients in Central America*. Journal of Clinical Microbiology. Oct. 2005. Vol. 43(10). p. 5065–68.
 12. Cardinal M., Reithinger R., Gürtler R., et al. *Use of an Immunochromatographic Dipstick Test for Rapid Detection of Trypanosoma cruzi in Sera from Animal Reservoir Hosts*. Journal of Clinical Microbiology. Agosto de 2006; Vol. 44(8): 3005-7.
 13. Roddy P, Goiri J, Flevaud L, et al. *Field Evaluation of a Rapid Immunochromatographic Assay for Detection of Trypanosoma cruzi Infection by Use of Whole Blood*. Journal of Clinical Microbiology. June 2008. Vol. 46(6): 2022–27.
 14. Umezawa ES; Bastos SF; Camargo ME; Yamauchi LM; Santos MR; González A; Zingales B; Levin MJ; Sousa O; Rangel-Aldao R; Da Silveira JF. *Evaluation of recombinant antigens for serodiagnosis of Chagas disease in South and Central America*. J Clin Microbiol 1999; 37(5): 1554-60.
 15. Lorca M, Contreras MC, Salinas P, Guerra A, Raychaudhuri S. *Evaluación de una prueba rápida para el diagnóstico de la infección por Trypanosoma cruzi en suero*. Parasitol. Latinoam, 2008, 63:29–33. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-77122008000100005>.
 16. Coutinho M & Dias JCP. *The rise and fall of Chagas Disease*. Perspectives on Science; 1999 (7): 447-85.
 17. Días JCP, Silveira AC & Schofield CJ. *The impact of Chagas Disease control in Latin America*. A review. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz. 2002, 97: 603-12.
 18. Dias JCP & Schofield CJ. *The evolution of Chagas Disease (American Trypanosomiasis) Control after 90 years since Carlos Chagas Discovery*. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 1999; 94 Suppl I: 103-22.
 19. Días JC. *La Enfermedad de Chagas como reto para la Salud Pública en Latinoamericana*. En Memorias del Primer Taller Internacional sobre Control

- de la Enfermedad de Chagas. VI Reunión de la Iniciativa Andina para el Control de la Enfermedad de Chagas, Bogotá, Colombia, 2005, p. 10-16.
20. Coura JR. *Síntese histórica e evolução dos conhecimentos sobre doença de Chagas*. In Clínica e Terapêutica da Doença de Chagas: uma abordagem prática para o clínico geral. JCP Dias & JR Coura (orgs.), Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ. 1997. p. 469-85.
 21. Programa Nacional de Chagas. Ministerio de Salud del Estado Plurinacional de Bolivia. *Informe Anual Epidemiológico*. La Paz, Bolivia, 2013.
 22. Organización Panamericana de la Salud – Organización Mundial de la Salud. Sistema Regional de Datos Básicos en Salud – Perfil de país. Resumen del análisis de situación y Tendencias de Salud – Bolivia. Versión actualizada al 9 de noviembre de 2004.
 23. Ministerio de Salud y Previsión Social: *Anuario Epidemiológico 2000*. La Paz, Bolivia, 2001.
 24. Zárate CR, Bladés N, Egüez K, et al.: *Detecção de anticorpos anti Trypanosoma cruzi em Crianças e Adolescentes de uma Área Endêmica para a Doença da Chagas na Bolívia*. Revista de la Sociedad Brasileira de Medicina Tropical, Uberaba (MG)-Brasil. 2001; Vol. 34 Supl III 17: 32.
 25. Organización Panamericana de la Salud, Ministerio de Salud y Acción Social. *Control de Calidad del Inmunodiagnóstico de la enfermedad de Chagas*. Manual de Procedimientos. Buenos Aires: Instituto Nacional de la Enfermedad de Chagas, IOPS, 1992.
 26. Atías A, Werner ATP. Capítulo 30: Enfermedad de Chagas. En Atías A; Neghme A: *Parasitología Clínica*. 3° ed. Publicaciones Técnicas Mediterráneo. Santiago de Chile; 1991. p. 255-67.
 27. Libdoc.who.int. *Chagas disease*. WHO, 2004. Disponible en : http://libdoc.who.int/publications/2004/9241592303_chap11.pdf
 28. Jano.es. Pruebas Diagnósticas: *Eficacia de una prueba diagnóstica: parámetros utilizados en el estudio de un test*. Ricardo Ruiz de Adana Pérez. Jano 1 de mayo 2009. N° 1736. Disponible en: http://www.jano.es/ficheros/sumarios/1/0/1736/30/00300032_LR.pdf.

29. Ministerio de Salud y Previsión Social, *Reporte de Vigilancia Epidemiológica 1994, 1996, 1997, 1998*. Secretaría Departamental de Salud. Sucre, Bolivia, 1999.
30. Cohen J. *A coefficient of agreement for nominal scales*. Educ. Psychol Meas; 1960. p. 37-46.
31. Facmed.unam.mx. Sociedad Española de Hipertensión. *Medidas de Concordancia para Variables Cualitativas*. España; Septiembre 2001 [actualizado en diciembre de 2001; acceso 19 de julio de 2014]. Disponible en :
http://www.facmed.unam.mx/deptos/salud/censenanza/plan2010/epiclin/unidad6/anexo6_8pres_concordancia.pdf
32. Landis J.R., Koch G.G. *The measurement of observer agreement for categorical data*. *Biometrics*. 1977; 33:159-74.
33. Chapuis F, Mauris A, Holst M, Albajar-Viñas P, Jannin J, Luquetti AO, Jackson Y. *Validation of a rapid immunochromatographic assay for diagnosis of Trypanosoma cruzi infection among Latin-American migrants in Geneva, Switzerland*. *J. Clin. Microbiol.* 2010, 48: 2948–52. Disponible en:
<http://dx.doi.org/10.1128/JCM.00774-10>.
34. Reithinger R, Grijalva MJ, Chiriboga RF, De Noya BA, et al. *Rapid detection of Trypanosoma cruzi in human serum by use of an immunochromatographic dipstick test*. *J. Clin. Microbiol.*, 2010, 48:3003. Disponible en : <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.02474-09>.
35. Arrieta R, Daquino B, Rosso N, et al. *Evaluación de una Metodología de Tamizaje en la Enfermedad de Chagas en San Luis, Argentina*. *Salud Pública de México*. 2004; Vol. 46(5): 432-7.
36. Sánchez C, Albajar-Viñas P, et al. *Comparative Evaluation of 11 Commercialized Rapid Diagnostic Tests for Detecting Trypanosoma cruzi Antibodies in Serum Banks in Areas of Endemicity and Nonendemicity*. *Journal of Clinical Microbiology*. May 2014 Vol. 52(7), Disponible en:
<http://jcm.asm.org/content/early/2014/05/02/JCM.00144-14.abstract>

37. Rojas MG, 2009. *Validación de la técnica rápida InBios Trypanosoma Detect™ para la enfermedad de Chagas, en niños de 1 a 5 años y madres de positivos en los municipios de Alcalá y Padilla. Marzo a Junio 2009.* Tesis presentada para obtener el grado Académico de Magister en Análisis Clínico. Universidad Andina Simón Bolívar. 2009. p. 60-61.
38. Ji MJ, Noh JS, Cho BK, Cho YS, Kim SJ, Yoon BS. *Evaluation of SD Bioline Chagas Ab Rapid kit.* Korean J. Lab. Med. 2009. 29:48–52. Disponible en : <http://dx.doi.org/10.3343/kjlm.2009.29.1.48>.
39. Villa, L., S. Morote, O. Bernal, D. Bulla, and P. Albajar-Vinas. *Access to diagnosis and treatment of Chagas disease/infection in endemic and nonendemic countries in the XXI century.* Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 2007, 102 Suppl. I: 87–93.

ANEXOS

REGISTRO DE DATOS COMPARATIVOS EVALUACIÓN PRUEBAS RÁPIDAS vs SEROLOGÍA CONVENCIONAL

Nº	Fecha	Código de muestra	Fecha de Nac	Edad	Sexo	Resultados					Conclusión Diagnóstica	Observaciones
						Inmunocromatografía		Serología Convencional				
	(dd/mm/aa)		(dd/mm/aa)	(años)	(M/F)	Stat-Pak (+/-/D)	InBIOS (+/-/D)	ELISA (D. O.) (R/NR/I)	HAI (Dils) (R/NR)	ELISA REC (D. O.) (R/NR/I)	(P/N)	

(+): Positivo (-): Negativo (D): Dudoso (R): Reactivo (NR): No Reactivo (I): Indeterminado (D. O.): Densidad óptica (Dils): Diluciones (P): Positivo (N): Negativo

ANEXO 3

EVALUACIÓN DE LA METODOLOGÍA BIOQUÍMICA

➤ **FORMULA PARA EL CÁLCULO DE LA SENSIBILIDAD**

$$S = \frac{VP}{VP + FN} * 100$$

➤ **FORMULA PARA EL CÁLCULO DE LA ESPECIFICIDAD**

$$E = \frac{VN}{FP + VN} * 100$$

➤ **FORMULA PARA EL CÁLCULO DE LA EFICIENCIA**

$$EF = \frac{VP + VN}{VP + FP + FN + VN} * 100$$

➤ **CÁLCULO DEL VALOR PREDICTIVO POSITIVO**

$$VPP = \frac{VP}{VP + FP} * 100$$

➤ **CÁLCULO DEL VALOR PREDICTIVO NEGATIVO**

$$VPN = \frac{VN}{FN + VN} * 100$$

ANEXO 4

COEFICIENTE KAPPA DE LANDIS Y KOCH

		Prueba de Referencia		
		Pos	Neg	
Prueba Diagnóstica Evaluada	Pos	a	c	f1
	Neg	b	d	f2
		c1	c2	n

$$P_o = (a + d) / n * 100$$

$$P_e = [(a + b) (a + c)] + [(c + d) (b + d)] / (a + b + c + d)^2$$

$$P_e = [(c1. f1) + (c2.f2)] / n^2$$

Kappa	Grado de concordancia
< 0	Sin concordancia
0 – 0,2	Insignificante
0,21 – 0,40	Bajo
0,41 – 0,60	Moderado
0,61 – 0,80	Bueno
0,81 – 0,90	Muy bueno
0,91 – 1,00	Excelente

P_o = Proporción de concordancia observada

P_e = Proporción de concordancia esperada por el azar

$$k = P_o - P_e / 1 - P_e$$

ANEXO 5

PRUEBAS EVALUADAS vs. ESTANDAR DE REFERENCIA

	POSITIVO con ELISA REC (persona con Chagas)	NEGATIVO con ELISA REC (persona sin Chagas)
POSITIVO con Chagas Stat-Pak™ e InBios™	Verdaderos Positivos VP	Falsos Positivos FP
NEGATIVO con Chagas Stat-Pak™ e InBios™	Falsos Negativos FN	Verdaderos Negativos VN

ANEXO 6. Información sobre el Producto



INSTRUCCIONES DE USO

Confirmación visual con línea de control de reactivo

CG101 -20 TEST KIT

CHAGAS STAT-PAK™

Test rápido de dos pasos para la detección de anticuerpos *Trypanosoma cruzi* en suero, plasma o sangre total

PARA USO DIAGNOSTICO *IN VITRO*

SOLO PARA USO PROFESIONAL

SOLO PARA USO FUERA DE LOS ESTADOS UNIDOS (EEUU)

LEER LAS INSTRUCCIONES CUIDADOSAMENTE ANTES DE UTILIZAR ESTE REACTIVO DIAGNOSTICO

USO O APLICACION

El CHAGAS STAT-PAK™ de Chembio es un reactivo diagnóstico inmunocromatográfico de tamizaje para la detección de anticuerpos anti-*Trypanosoma cruzi* en suero, plasma o sangre total. El taco (también denominado dispositivo o cassette) para cada reacción es de uso único, NO puede ser reutilizado. Junto con otros criterios, esta reacción serológica es útil para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas.

FUNDAMENTO

La enfermedad de Chagas es causada por el *T. cruzi*, un parásito protozoo de humanos y de una variedad de especies animales, algunas de ellas domésticas. Es un problema importante de salud pública en América Latina, y de creciente preocupación en Estados Unidos y Europa debido al aumento de inmigrantes infectados [1,2]. En América Latina se estima que 120 millones de personas, o sea 25 % de la población, habitan áreas con riesgo de infección. Se estima en 18 millones el número de habitantes de zonas rurales y urbanas infectados por *T. cruzi* [2].

La mayor parte de los individuos infectados que se diagnostican serológicamente padecen la infección crónica y corren el riesgo de sufrir consecuencias cardíacas o digestivas. En ciertos casos, la enfermedad de Chagas puede conducir a una insuficiencia cardíaca fatal, hecho que acentúa la necesidad de un diagnóstico serológico temprano de la infección. El control y seguimiento de esta cardiopatía aumenta notoriamente la expectativa de vida del paciente [3, 4, 5].

La infección ocurre cuando un insecto hematófago de la familia de los Triatomíneos (vinchuca en el sur del continente, barbeiro en Brasil), se alimenta del huésped, momento en el que deposita defecaciones con *T. cruzi*. En países donde no se controla la infección en donantes de sangre, esta puede contraerse por vía transfusional.

Otras vías de infección son la transmisión materno-fetal (Chagas congénito) oral, en el caso de ingestión de productos contaminados por *T. cruzi* y eventualmente en ocasión de trasplante de órganos. En recién nacidos de madres con enfermedad de Chagas, la tasa de infección es de entre 3 a 10 % dependiendo de la región geográfica.

En la actualidad no existen vacunas o quimioterapias preventivas para la enfermedad. Sin embargo, hay medicamentos que son eficientes cuando se administran a niños en la fase aguda o crónica reciente de la infección.

Los antígenos recombinantes son una herramienta conveniente para mejorar los métodos de diagnóstico serológico de la enfermedad de Chagas. También se dispone de una serie de

reactivos de diagnóstico serológico basados en técnicas de inmunofluorescencia, hemaglutinación, fijación del complemento, radioinmunoensayo y ELISA [6,7,8].

El CHAGAS STAT-PAK™ de Chembio es un reactivo inmunocromatográfico que emplea una combinación única de antígenos recombinantes de *T. cruzi* para la detección específica de anticuerpos contra el parásito. Es rápido, simple, fácil de usar y puede ser almacenado a temperatura ambiente.

PRINCIPIOS

El CHAGAS STAT-PAK™ de Chembio es una reacción diagnóstica inmunocromatográfica de tamizaje para la detección de anticuerpos anti-*T. cruzi*. El método emplea una combinación única de proteínas recombinantes fijada a una membrana que retiene los anticuerpos específicos, conjugados con partículas coloreadas. La reacción diagnóstica tiene un gran nivel de sensibilidad y especificidad.

La muestra se aplica en el pocillo SAMPLE. A medida que la muestra fluye lateralmente sobre la membrana, las inmunoglobulinas humanas se asocian a partículas coloreadas.

Si la muestra contiene anticuerpos anti-*T. cruzi*, estos se unirán al antígeno fijado a la membrana en el área denominada TEST produciendo una línea rosa-púrpura. En ausencia de anticuerpos anti-*T. cruzi* esta línea no aparece. El CHAGAS STAT-PAK™ de Chembio proporciona al mismo tiempo, un control interno que detecta la presencia de IgG en la muestra. De esta manera, la muestra al continuar su migración producirá una línea rosa-púrpura en la zona CONTROL. La detección de esta línea demuestra que el reactivo está funcionando correctamente.

COMPONENTES DEL KIT STAT-PAK

Cada kit contiene los siguientes componentes para realizar 20 determinaciones:

1. 20 tacos Chembio CHAGAS STAT-PAK™
2. 20 tubos Microsafe® (10 µL) para coleccionar sangre capilar
3. 1 botella de diluyente (6ml)
4. 1 instructivo

Material adicional requerido (no provisto):

1. Reloj
2. Pipeteador (5 µL para suero o plasma; para sangre usar 10 µL)
3. Para toma de sangre capilar, lancetas estériles descartables luego de una única punción
4. Gasa estériles con alcohol

ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD

El CHAGAS STAT-PAK™ se debe almacenar a una temperatura entre 8-30° C en su envase original sellado. La botella de diluyente se debe almacenar a 8-30° C, el kit es estable hasta la fecha impresa en el rótulo de la caja y/o envase original.

NOTA: No use reactivos con fecha de validez vencida !

PRECAUCION: NO CONGELAR NINGUNO DE LOS COMPONENTES DE ESTE REACTIVO DIAGNOSTICO.

PRECAUCIONES

1. Las pruebas son para USO DIAGNOSTICO IN VITRO únicamente. Solo para USO PROFESIONAL. Cada reacción solo debe usarse de acuerdo a las instrucciones adjuntas en el kit.
2. Manipule todas las muestras como se recomienda en el manual de CDC-NIH, Bioseguridad en Laboratorios Microbiológicos y Biomédicos, 4º Ed.1999 para cualquier muestra de suero o sangre humana potencialmente infecciosa.
3. Use ropa con la protección conveniente (guantes, guardapolvo o bata de laboratorio, lentes de seguridad) cuando manipule muestras. Durante la toma de muestra o el examen, evite cualquier contacto con las manos, ojos, nariz o boca.
4. No pipetee ningún material con la boca. No fume, coma o beba en áreas donde hay muestras o reactivos.
5. Después de completar el ensayo, autoclave todo el material por 1 hora a 125 ° C. Alternativamente, el material puede ser tratado con una solución de hipoclorito de sodio al 10%. Descarte el material cuidadosamente en bolsas de bioseguridad.
6. No mezclar reactivos de lotes diferentes.

TOMA DE MUESTRA

El CHAGAS STAT-PAK™ de Chembio es una reacción diagnóstica que se realiza en sangre total, suero o plasma.

Sangre total: Colectar sangre total en tubos conteniendo heparina, EDTA o citrato de sodio. Para sangre capilar, pinche el dedo y descarte la primera gota. Colecte la segunda gota con un tubo Microsafe® descartable de 10 µL (provistos). No presione el dedo demasiado fuerte. Siga el procedimiento indicado en las instrucciones.

Suero: El suero es obtenido de la sangre total tomada asépticamente por punción venosa en un tubo limpio sin anticoagulante.

Permita la coagulación de la sangre a temperatura ambiente. Centrifugar la sangre a 2000 r.p.m. por 10 minutos a temperatura ambiente. Separe el suero del coágulo lo más rápidamente posible para evitar hemólisis.

Plasma: Colecte sangre total con anticoagulante (heparina, EDTA o citrato de sodio), centrifugue a 2000 r.p.m. por 10 minutos y separe el plasma sobrenadante.

Es mejor realizar las reacciones inmediatamente después de la toma de muestra. Las muestras deberán ser refrigeradas inmediatamente después de la toma de muestra a 2-8° C y pueden ser usadas dentro de los 3 días subsiguientes. Si no es posible realizar la prueba en 3 días, las muestras deberán ser congeladas (-20° C o a temperatura más bajas).

NOTA: Si las muestras son enviadas, deberán ser empaquetadas de acuerdo con las regulaciones de transporte de agentes infecciosos.

CONFIRMACION VISUAL DE LA LINEA DE CONTROL DE REACTIVOS

El CHAGAS STAT-PAK™ de Chembio es la única reacción diagnóstica rápida que proporciona una confirmación visual de la línea de control de reactivos ANTES de realizar el ensayo. Cuando vea el taco, notará que hay una banda coloreada de AMARILLO en el área de CONTROL. Este complejo coloreado indica que los reactivos necesarios para que la prueba funcione correctamente ESTAN presentes y activos. Después agregar la muestra, la banda AMARILLA migra a lo largo de la membrana con el frente de corrida del conjugado coloreado y sale completamente del taco.

Cuando la prueba finaliza, se observará la línea rosa-púrpura en el área CONTROL del taco en muestras positivas o negativas (esto sirve como un control interno de inmunoglobulina G - IgG) y confirma que la reacción se realizó correctamente. Una línea rosa-púrpura en las áreas TEST y CONTROL indica un resultado positivo.

PROCEDIMIENTO

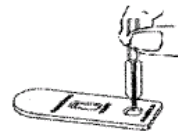
1. Si la muestra está refrigerada, sáquela del refrigerador y permita que alcance temperatura ambiente antes de realizar la reacción.
2. Saque el número de tacos de CHAGAS STAT-PAK™ de sus envolturas rasgando a lo largo del área de la muesca y póngalos en una superficie plana.
3. Identifique el taco con el nombre del paciente o un número de identificación.
4. Para sangre capilar, pinche el dedo y descarte la primera gota. Colecte la segunda gota con un tubo Microsafe® sosteniéndolo en posición horizontal como se muestra en la figura:



NUNCA PRESIONE EL BULBO DEL TUBO MIENTRAS TOMA LA MUESTRA

Tocar con la punta del tubo la gota de sangre, la cual por capilaridad, llegará hasta la línea de llenado.

5. Depositar la muestra en el centro del pocillo SAMPLE.



SOLO SI LA MUESTRA NO SALE DEL TUBO, sostenga el Microsafe® Tube verticalmente y deslice el dedo sobre el agujero de respiradero cerca de la línea negra. Después alíñe la extremidad con el pocillo SAMPLE y presione el bulbo



Si analiza una muestra que no sea de sangre capilar utilice una pipeta exacta y agregue la cantidad requerida en el pocillo de muestra (SAMPLE)

- a) suero o plasma: 5 µL
- b) sangre total: 10 µL

6. Invertir la botella de diluyente y sostenerla verticalmente (no angularmente) sobre el pocillo de la muestra SAMPLE. Añadir el diluyente lentamente gota a gota, 6 gotas (~ 240 µL) en el pocillo SAMPLE.



7. Lea los resultados dentro de los 15 minutos después del agregado del diluyente. Espere que trascurren 15 minutos para tomar en consideración un resultado negativo.

No leer ningún resultado después de los 15 minutos

NOTA: El volumen de la muestra es crítico, use una pipeta de precisión. Si coloca más de 5 µL de suero o plasma o más de 10 µL de sangre la sensibilidad disminuye

CONTROL DE CALIDAD

Una línea de color rosa-púrpura aparecerá siempre en el área CONTROL si la prueba se realizó correctamente y el taco esta trabajando apropiadamente. Esto sirve como control interno para demostrar la presencia de IgG.

Las Buenas Prácticas de Laboratorio (GLP) recomiendan el uso de materiales de control junto con las muestras para asegurar el funcionamiento correcto del kit. Controles comerciales de suero o plasma positivos y negativos deberán ser usados para este propósito. Use los controles, según las instrucciones del PROCEDIMIENTO de este instructivo.

INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS

Resultado Negativo



Una sola línea color rosa-púrpura, en el área CONTROL, y ninguna en el área TEST indica un resultado negativo. Un resultado negativo a los 15 minutos indica que no se detectaron anticuerpos anti-*T. cruzi* en la muestra.

Resultado Positivo

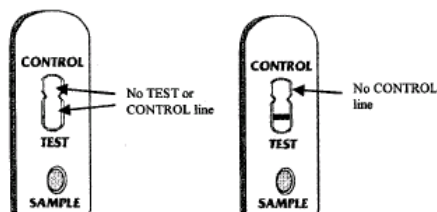


La aparición en el plazo de 15 minutos de dos líneas color rosa-púrpura, una en el área CONTROL y otra en el área TEST, indican un resultado positivo. La intensidad de la línea en el área TEST puede ser diferente de la línea del área de CONTROL (ver nota).

NOTA: Las intensidades de las líneas TEST Y CONTROL pueden variar. Si una línea visible aparece en el área TEST, aunque sea muy tenue, y otra aparece en el área CONTROL, el resultado es POSITIVO.

Resultado Invalido

Una línea de color rosa-púrpura aparecerá siempre en el área CONTROL, aparezca o no la línea TEST. Si no se ve la línea rosa-púrpura en el área CONTROL, la prueba NO es válida, y deberá repetirse usando un nuevo taco.



Un resultado inválido indica un problema de funcionamiento relacionado con la muestra o con el taco. Si Ud. no puede obtener un resultado válido luego de repetir el ensayo, contáctese con Chembio Diagnostic Systems al +1-631-924-1135 ext. 114 o a info@chembio.com.

RESULTADOS ESPERADOS

Esta es una reacción diagnóstica cualitativa para la detección de anticuerpos anti-*T. cruzi* en sangre, suero o plasma. La presencia de anticuerpos sugiere infección con *T. cruzi* y da una reacción positiva. En ausencia de infección se observará un resultado negativo. Estas conclusiones se basan en el análisis de más de 5,000 reacciones realizadas con el CHAGAS STAT-PAK™ en varios países de América Latina.

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

El procedimiento del CHAGAS STAT-PAK™ y la interpretación de los resultados deberá ser realizado correctamente. El taco está diseñado para detectar anticuerpos contra *T. cruzi* en suero humano, plasma o sangre total. Ningún resultado de este ensayo con otros líquidos corporales, de pool de sueros o plasma puede ser tenido en cuenta.

Para confirmar la reacción de muestras positivas por inmunocromatografía es recomendable realizar una prueba más específica de referencia, junto con una evaluación clínica de los pacientes antes de llegar a un diagnóstico definitivo. Un resultado negativo no excluye la posibilidad de infección con *T. cruzi*.

CARACTERISTICAS DE FUNCIONAMIENTO.

El CHAGAS STAT-PAK™ utiliza una mezcla de proteínas recombinantes que fija anticuerpos específicos. La sensibilidad del CHAGAS STAT-PAK™ es equivalente a la de otros reactivos diagnósticos comerciales para la enfermedad de Chagas.

Sensibilidad y especificidad

Se realizaron ensayos clínicos para evaluar el CHAGAS STAT-PAK™ de Chembio. En un estudio [9], se evaluó un panel de 393 muestras de sueros codificados de pacientes de áreas endémicas del Brasil. 200 de estas muestras eran de pacientes chagásicos muy bien definidos y se incluyeron en este estudio 150 muestras de individuos sanos. Las 350 muestras fueron confirmadas por serología convencional (inmunofluorescencia indirecta, IIA, hemaglutinación indirecta HAI, y ELISA). Se observaron los siguientes resultados:

		CHAGAS STAT PAK™		
		POSITIVO	NEGATIVO	TOTAL
IIA/ HAI/ ELISA	POSITIVO	197	3	200
	NEGATIVO	6	144	150
	TOTAL	203	147	350

Los resultados muestran una sensibilidad de 98.5% y una especificidad de 96.0%. Además, se examinaron 43 sueros de individuos que no estaban infectados con *T. cruzi*, pero que tenían otras infecciones: (N=9) leishmaniasis visceral, (N=10) leishmaniasis mucocutánea, (N=3) SIDA, (N=11) hepatitis B. También se analizaron diez pacientes con enfermedades autoinmunes. Solo 4 sueros de los 43 (N=2 con leishmaniasis visceral y N=2 con hepatitis B) dieron un resultado positivo con CHAGAS STAT-PAK™. Así, para los 193 sueros de individuos sin enfermedad de Chagas, el reactivo dio una especificidad de 94.8%. Es importante mencionar que de las 19 muestras de pacientes con leishmaniasis, 10 habían sido diagnosticados positivos para *T. cruzi* por métodos de serología convencional (IIA, HAI, ELISA).

En el mismo estudio [9], con 352 muestras de suero de 4 países diferentes de Latinoamérica, el CHAGAS STAT-PAK™ exhibió una sensibilidad de 100% y una especificidad de 98.6%, comparado con serología convencional (IIA, HAI, ELISA). Esos resultados se detallan en el siguiente cuadro:

PAIS	N° DE INDIVIDUOS	CHAGASICOS	NO CHAGASICOS
		STAT PAK™ Positivos /Total	STAT PAK™ Positivos/Total
Honduras	204	157/157	0/47
Venezuela	45	40/40	0/5
Bolivia	21	10/10	0/11
Argentina	82	72/72	1/10
Total:	352	279/279	1/73

Otro estudio se realizó analizando 5998 sueros de individuos de Honduras, El Salvador y Nicaragua. Se comparó el CHAGAS STAT-PAK™ con un test comercial ELISA [10].

		CHAGAS STAT PAK™		
		POSITIVO	NEGATIVO	TOTAL
ELISA	POSITIVO	1328	3	1331
	NEGATIVO	0	4667	4667
	TOTAL	1328	4670	5998

La sensibilidad y la especificidad del CHAGAS STAT-PAK™ comparada con el ELISA fue de 99.8% y 100% respectivamente.

De los 5998 sueros, 3400 eran de donantes de sangre y se encontró un nivel de reacciones positivas de 4.6%, usando ambos reactivos, CHAGAS STAT-PAK™ y ELISA. Para estos 3400 sueros, la correlación entre el ELISA y el CHAGAS STAT-PAK™ fue de 100%.

Precisión

Intraensayo

Dentro de una misma corrida, la precisión fue determinada usando 10 replicas de tres sueros con diferentes concentraciones de anticuerpos. Los valores negativos y positivos se identificaron correctamente en un 100% de las reacciones.

Interensayo

Entre diferentes corridas, la precisión fue determinada usando las mismas tres muestras, en 10 replicas diferentes con tres kits de lotes diferentes, durante un periodo de 6 meses. De igual manera, los resultados positivos y negativos concordaron en un 100% de los casos.

Interferencias y reacciones cruzadas

La reacción CHAGAS STAT-PAK™ fue evaluada usando varios sueros con diferentes títulos de anticuerpos anti-*T. cruzi* y muestras con diversas sustancias. No se observó interferencia alguna de bilirrubina, hemoglobina y triglicéridos con la reacción CHAGAS STAT-PAK™. Niveles de factor reumatoideo de hasta de 80 IU/ml no interfieren con el ensayo, pero niveles más altos pueden dar falsos positivos. En este estudio no se observaron reacciones cruzadas de sueros de pacientes con Leishmaniasis cuando se usó CHAGAS STAT-PAK™.

REFERENCIAS

1. TDR Strategic Direction: Chagas disease (2002) Strategic Direction for Research: Chagas Disease. UNDP/World Bank/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases (TDR), available at www.who.int/tdr
2. Morel, C.M., Lazdins, J. (2003) Chagas Disease. *Nat Rev Microbiol* 1: 14-15.
3. Elizari, M.V. (1999) Chagastic myocardiopathy: historical perspective (in Spanish). *Medicina (B Aires)* 59 Suppl. 2 : 25-40.
4. Schijman, A.G., Vigliano, C.A., Viotti, R.J., Burgos, J.M., Brandariz, S., Locono, B.E., Leze, M.L., Armenti H.A., Levin, M.J. (2004) *Trypanosoma cruzi* DNA in cardiac lesions of Argentinean patients with end-stage chronic Chagas heart disease. *Am J Trop Med Hyg* 70 : 210-220.
5. Kirchhoff, L.V. (1996) American trypanosomiasis (Chagas' disease). *Gastroenterol Clin North Am* 25 : 517-533.
6. Levin M.J., da Silveria J.F., Frasch A.C.C., *et al.* (1991) Recombinant *Trypanosoma cruzi* antigens and Chagas' disease diagnosis: analysis of a workshop. *FEMS Microbiol Immunol* 89 : 11-20.
7. de Andrade, A.L., Martinelli, C.M., Luquetti, A.O., de Oliveira, O.S., Almeida e Silva, S., Zicker, F. (1992) Serologic screening for *Trypanosoma cruzi* among blood donors in central Brazil. *Bull Pan Am Health Organ* 26 : 157-164.
8. da Silveira, J.F., Umezawa, E.S., Luquetti, A.O. (2001) Chagas disease: recombinant *Trypanosoma cruzi* antigens for serological diagnosis. *Trends Parasitol* 17 : 286-291.
9. Luquetti, A.O., Ponce, C., Ponce, E., Esfandiari, J., Schijman, A., Revollo, S., Añez, N., Zingales, B., Rangel-Aldao, R., Gonzales, A., Levin, M., Umezawa, E.S., da Silveira, J.J. (2003). Chagas' disease diagnosis: a multicentric evaluation of Chagas Stat Pak, a rapid immunochromatographic assay with recombinant proteins of *Trypanosoma cruzi*. *Diag Microbiol Infect Dis.* 46:265-271.
10. Ponce, C., Ponce, E., Vinelli, E., Montoya, A., de Aguilar, V., Gonzales, A., Zingales, B., Rangel-Aldao, R., Levin, M., Esfandiari, J., Umezawa, E.S., Luquetti, A.O., da Silveira, J.F. (2005) Validation of a Rapid and Reliable Test for Diagnosis of Chagas' Disease by detection of *Trypanosoma cruzi* - Specific Antibodies in Blood of Donors and Patients in Central America. *J Clin Microbiol* 43:5065-5068.

PARA MAS INFORMACION, CONTACTE CHEMBIO DIAGNOSTIC SYSTEMS, INC.

3661 HORSEBLOCK ROAD
MEDFORD, NY 11763
USA

Tel : (631) 924-1135

Fax : (631) 924-6033

Email : info@chembio.com

Web Site : www.chembio.com

IFORMACION DE ORDENES CGI01 CHAGAS STAT-PAK, 20 Tests

ANEXO 7. Información sobre el Producto



Chagas Detect™ Plus Rapid Test

for the Detection of Antibodies to *T. cruzi* in Human Serum or Whole Blood

For Research Use Only

1 Intended Use

The Chagas Detect™ Plus Rapid Test is a rapid immunochromatographic strip assay for the qualitative detection of antibodies to *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) in human serum or whole blood samples. Reactive assay results are presumptive evidence of chagas infection. *For research use only.* Not for use in diagnostic procedures.

2 Summary and Explanation

Chagas disease is caused by the flagellated protozoa *Trypanosoma cruzi* and is an endemic infection in Central and South America that affects 16 to 18 million individuals¹. Over the last several years with intensive eradication campaigns directed against the triatomine, vector transmission of *T. cruzi* diminished drastically, particularly in rural areas, and does not exist today in many regions where the infection used to be endemic. However, the transfusion of parasite-containing blood continues to be an important mode of transmission^{2,3,4}. Several strategies exist for the diagnosis of Chagas disease. Direct detection of the parasite in the blood by microscopy, hemoculture, xenodiagnosis, or PCR is highly specific and confirms the existence of an infection^{4,5}. However, these procedures are technically and operationally demanding. Other tests currently used include measurement of antibodies against crude lysate, complement fixation, indirect hemagglutination, and fluorescent antibody (IFA). All are lacking specificity and/or sensitivity^{5,6,7,8}. Serologic tests that detect antibodies specific for antigens expressed by the different developmental stages of the parasite are well suited for a fast and easy diagnosis of the disease^{9,10,11,12,13}. In an attempt to improve the serological diagnosis of Chagas disease, we have identified and used a multi-epitope recombinant antigen derived from different *T. cruzi* antigens.

3 Principle

The Chagas Detect™ Plus Rapid Test is a qualitative, membrane-based immunoassay for the detection of

antibodies to *T. cruzi* in human serum. The rapid test membrane is pre-coated with a recombinant antigen on the test line region and utilizes a separate control to assure assay flow and performance. During testing, the test sample (serum or whole blood) is added to the sample pad and a proprietary blend of a stable liquid conjugate labeled with protein A is added to the sample pad. The conjugate and serum mixture migrates upward on the membrane (via capillary action) to react with recombinant *T. cruzi* antigen on the membrane. If antibodies to the *T. cruzi* antigen are present, a red line will appear at the test line. The red line at the control region should always appear if the assay is performed correctly. The presence of this red line verifies that proper flow has occurred and catastrophic failure of the conjugate has not occurred.

The entire procedure takes approximately 20 minutes.

4 Precautions

- Do not use the test after expiration date.
- Handle all sera and kits used as if they contain infectious agents. Observe established precautions against microbiological hazards while performing all procedures and follow the standard procedures for the proper disposal of sera and used kits.
- Wear protective clothing, eye protection and disposable gloves while performing the assay. Wash hands thoroughly when finished.
- Avoid all contact between hands and eyes or mucous membranes during the testing.
- Do not eat, drink or smoke in the area where the sera and kits are handled.
- All solutions contain a preservative. Avoid all possible contact with the skin and mucous membranes.

5 Kit Contents and Storage

1. Fifty (50) rapid tests in plastic cassette housing, individually pouched. Store at room temperature.
2. One (1) vial of Gold Solution, 3ml. Store at room temperature.
3. One (1) vial of Chase Buffer Type A, 6ml. Store at room temperature.

Provided optionally:

1. Fifty (50) transfer pipettes. Store at room temperature.

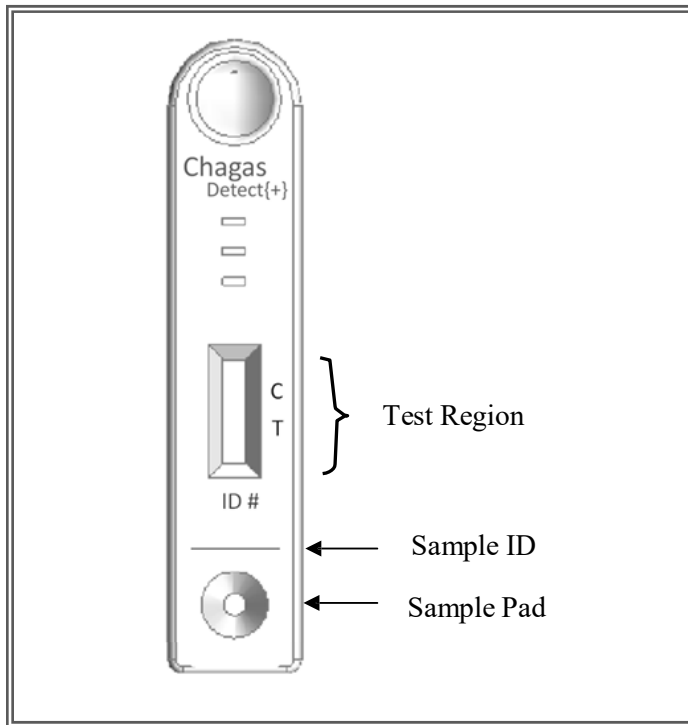
6 Procedure

Before beginning, review all directions and limitations in this procedure.

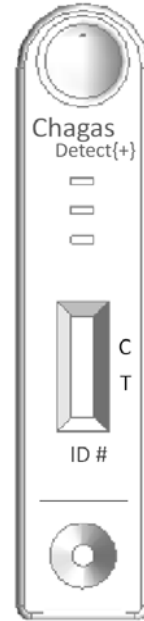
Remove the Chagas Detect™ Plus Rapid Test from the foil pouch and ensure that no physical damage (e.g., scratched membrane at the Test Region) is apparent on the rapid test. Bring all test samples to room temperature before beginning this procedure.

Observe the test format shown below. Note the locations of the Test Region, Sample ID, and Sample Pad. The Test Region has two markings: (C) for the control line and (T) for the test line.

Test Format

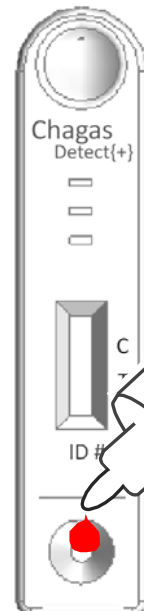


1. Lay the cassette onto a clean, flat surface. Write the Patient name or ID# using an indelible marker at the Sample ID line.
2. Transfer 5 μ l of serum sample or 5 μ l of freshly drawn whole blood directly to the Sample Pad. Use an appropriately sized pipetter and tip or the optionally included transfer pipette.



5 μ l Sample

3. Slowly add one full drop (approximately 40 μ l) of Gold Solution to the Sample Pad. ***It is important that only one full drop is added.*** Exceeding this amount could result in incomplete clearing of the test and interfere with result reading.



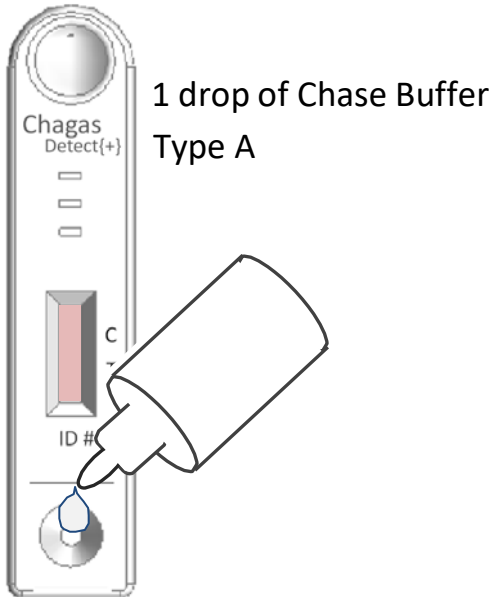
1 drop of Gold Solution

- Wait 5 minutes (+/- 30 seconds).

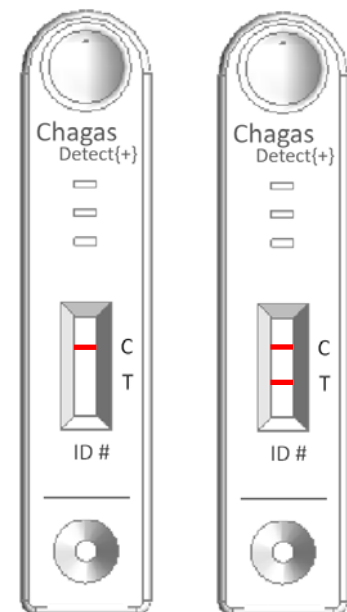


5 minutes

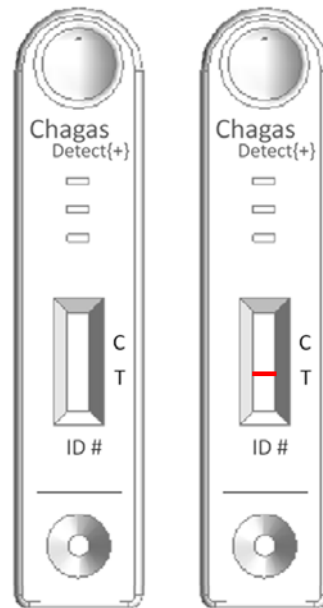
- Add one full drop (approximately 40µl) of Chase Buffer Type A to the Sample Pad.



- Read and interpret the rapid test after 15 additional minutes. (20 minutes total test time). Do not interpret results at later time points.



Negative Positive



Invalid Results

7 Interpretation of Results

7.1 A Positive Result

The test is positive for *T. cruzi* antibodies when the control line (C) and the test line (T) appear in the test area. A faint but clear test line is considered a positive result. As a guide for interpretation, the red color in the test region will vary depending on the concentration of the anti-*T. cruzi* antibodies present. The test line for ‘weakly positive’ sera samples may show a weak positive but distinctly red line. *The presence of a weak red test line should be considered a positive result.*

Note: The red color in the test region will vary depending on the concentration of antibodies present. However, neither the quantitative value nor the rate of increase in antibodies can be determined by this qualitative test.

7.2 A Negative Result

The test is negative when only the control line (C) appears. No test line is present.

7.3 An Invalid Result

The test is invalid if the control line (C) does not appear, regardless of whether a line is seen at the test line (T) area. It is recommended to retest using a new Chagas Detect™ Plus Rapid Test and fresh serum or whole blood.

8 Troubleshooting

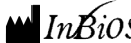
1. *The test line is very strong but the control line remains weak.* It is possible for the test line to react so strongly that the flow of the solutions up the membrane is entirely blocked. This will cause the membrane beneath the test line to remain pink. In this situation, the sample should certainly be considered positive as long as a minimally weak control line is present.
2. *No Gold Solution is flowing up the test region.* Ensure that one full drop (40µl) of Gold Solution was added to the sample pad.

9 Limitations

- For research use only. Not for use in diagnostic procedures.
- This test will only indicate the presence of antibodies to our recombinant antigen in human serum/whole blood.
- Do not use serum or whole blood samples containing any glycerol or other viscous materials. This will compromise the sensitivity of the assay dramatically.
- Do not use highly hemolyzed or aged samples. Highly hemolyzed samples will interfere with test performance.

References

- ¹ Mocayo A. Chagas' disease. Epidemiology and prospects for interruption of transmission in the Americas. World Health Stat Q. 1992; 45:276-279.
- ² Schimunis G A. *Trypanosoma cruzi*, the etiologic agent of Chagas' disease: status in the blood supply in endemic and non-endemic countries. Transfusion. 1991; 31:547-557.
- ³ Schimunis G A. Prevention of transfusional *Trypanosoma cruzi* infection in Latin America. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1999; 94(Suppl. 1):93-101.
- ⁴ Camargo, M E. An appraisal of Chagas' disease serodiagnosis. In: Wendell S, Brener Z, CamargoME, Rassi A. , editors;Wendell S, Brener Z, Camargo M E, Rassi A. , editors. Chagas' disease (American trypanosomiasis): its impact on transfusion and clinical medicine. ISBT Brazil 92. So Paulo, Brazil: Sociedade Brasileira de Hematologia e Hemoterapia; 1992. pp. 165-178.
- ⁵ Ferreira A W, Belem Z R, Moura M E G, Camargo M E. Aspectos da padronizacao de testes sorologicos para doenca de Chagas: um teste imunoenzimico para a triagem de doadores de sangue. Rev Inst Med Trop S Paulo. 1991;33:(2)123-128.
- ⁶ Oelemann W M R, Teixeira M G M, Verissimo Da Costa G C, et al. Evaluation of three commercial enzyme-linked immunoabsorbant assays for diagnosis of Chagas' disease. J Clin Microbiol. 1998; 36:2423-2427.
- ⁷ Chiller T M, Samudio M A, Zoulek G. IgG antibody reactivity with *Trypanosoma cruzi* and Leishmania antigens in sera of patients with Chagas' disease and leishmaniasis. Am J Trop Med Hyg. 1990; 43:650-656.
- ⁸ Oelemann W M R, Teixeira M G M, Peralta J M. Screening and confirmation in chagas disease serology-a contribution. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1999;94(Suppl. 1):307-308.
- ⁹ Umezawa E S, Bastos S F, Camargo M E, Yamauchi L M, Santos M R, Gonzales A, Zingales B, Levin M J, Sousa O, Rangel-Aldao R, Silveira J F. Evaluation of recombinant antigens for serodiagnosis of Chagas' 1999;37:1554-1560.
- ¹⁰ Vergara U, Lorca M, Veloso C, Gonzales A, Engstrom E, Aslund L, Pettersson U, Frasch A C C. An assay for detection of *Trypanosoma cru zi* antibodies in human sera based on the reaction with synthetic peptides. J Clin Microbiol. 1991;29:2034-2037.
- ¹¹ Vergara U, Veloso C, Gonzales A, Lorca M. Evaluation of an enzyme-linked immunoabsorbant assay for the diagnosis of Chagas' disease using synthetic peptides. Am J Trop Med Hyg. 1992;46:39-43.
- ¹² Peralta J M, Teixeira M G, Shreffler W G, Pereira J B, Burns J M, Sleath P R, Reed S G. Serodiagnosis of Chagas' disease by enzyme-linked immunoabsorbant assay using two synthetic peptides as antigens. J Clin Microbiol. 1994;32:971-994.
- ¹³ Houghton R L, Benson D R, Reynolds L D, McNeill P D, Sleath P R, Lodes M J, Skeiky Y A, Badaro R, Krettli A U, Reed S G. Multiepitope synthetic peptide and recombinant protein for the detection of antibodies to *Trypanosoma cruzi* in patients with treated or untreated Chagas' disease. J Infect Dis. 2000;181:325-330.

 InBios International, Inc.
562 1st Ave. South, Suite 600,
Seattle, WA 98104 USA
206-344-5821
Insert Part No. 900131-00
Catalogue No. CP030 and CP050
Effective Date: 04/09/2013

ANEXO 8

PROCEDIMIENTOS DE DIAGNÓSTICO

Procedimiento Técnico para el Diagnóstico de la Enfermedad de Chagas

1. INMUNOCROMATOGRAFÍA (STAT-PAK™, Chembio Diagnostics Systems, Inc.)

PRINCIPIO DE LA PRUEBA UTILIZANDO MUESTRAS DE SANGRE TOTAL

(punción digital)

El ensayo CHAGAS STAT-PAK™ de Chembio es una prueba diagnóstica rápida inmunocromatográfica para detectar los anticuerpos contra *T. cruzi*. El método emplea una única combinación de una proteína vinculada a anticuerpos específicos que se conjuga para teñir partículas y antígenos ligados a la membrana (fase sólida). El ensayo muestra un alto grado de sensibilidad y especificidad. La muestra se aplica al pozo SAMPLE. A medida que la muestra fluye lateralmente por la membrana, el tinte conjugado de la proteína vinculada a anticuerpos específicos se une a la inmunoglobulina humana en la muestra. Si la muestra contiene anticuerpos anti *T. cruzi*, el complejo se une a los antígenos en la fase sólida en el área TEST apareciendo una línea rosa/púrpura. En ausencia de anticuerpos anti *T. cruzi* no aparece ninguna línea en el área TEST. La prueba CHAGAS STAT-PAK™ de Chembio también proporciona un control antígeno IgG interno. La muestra continúa migrando por la membrana y aparece una línea rosa/púrpura en la zona CONTROL demostrando que los reactivos funcionan adecuadamente.

Material proporcionado: Cada kit contiene los siguientes artículos para realizar 20 pruebas

- 20 pruebas CHAGAS STAT-PAK™
- 20 tubos Microsafe® (10 µl) para punción digital (sangre total)
- 1 disolvente (6 ml)
- 1 prospecto sobre el producto

Materiales requeridos pero no proporcionados

- Temporizador

- Lancetas estériles de un solo uso (para muestras de sangre total a través de punción digital únicamente)
- Desinfectante
- Guantes no estériles

CONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD

El ensayo CHAGAS STAT-PAK™ deberá conservarse a entre 8-30°C en la bolsa sellada original. Los disolventes también deben conservarse a entre 8-30°C. El kit es estable hasta la fecha de caducidad impresa en la etiqueta de la caja y/o bolsa.

NOTA: No utilizar kits caducados. – NO CONGELAR LOS KITS

PRECAUCIONES

La prueba es SÓLO para USO DIAGNÓSTICO IN VITRO. Utilizar la prueba únicamente de acuerdo con las instrucciones proporcionadas con el kit.

Manejar todos los especímenes tal como se recomienda para suero humano infeccioso o espécimen de sangre en el manual DCD-NIH, Bio safety in Microbiological and Biomedical Laboratories, 4ª ed., 1999.

Utilizar vestimenta protectora adecuada (guantes, bata de laboratorio, gafas de seguridad) cuando se manejen las muestras. Evitar cualquier contacto con manos, ojos, nariz o boca durante la recogida de muestras para análisis.

No utilizar la pipeta o absorber ningún material utilizando la boca. No fumar, beber o comer en las zonas donde se guardan los especímenes y materiales del Kit.

Eliminar el material con cuidado en bolsas “biopeligrosas”.

No mezclar reactivos de diferentes lotes de kits.

RECOGIDA DE ESPECIMENES-

Sangre por punción digital:

Pinchar el dedo y limpiar la primera gota de sangre. Recoger la segunda gota en un tubo Microsafe® de 10 µl (proporcionado). No apretar el dedo demasiado fuerte. Seguir las instrucciones que vienen con la prueba.

Las muestras de los pacientes pueden trabajarse mejor cuando se analizan inmediatamente después de su recogida.

CONFIRMACIÓN DE LA EJECUCIÓN DE LA PRUEBA

El ensayo CHAGAS STAT-PAK™ de Chembio es la única prueba rápida que proporciona confirmación visual de los reactivos mediante línea de control ANTES de realizar la prueba. La prueba consta de una banda AMARILLA en el área de CONTROL en la tarjeta de reacción. Este complejo coloreado indica que los reactivos necesarios para que la prueba funcione adecuadamente REALMENTE ESTÁN presentes de un forma activa. Tras añadir la muestra, esta banda AMARILLA migra por la membrana en el margen guía del conjugado teñido y se saca completamente del dispositivo para realizar la prueba. Una vez se ha completado el análisis, se observará la ya familiar línea rosa/púrpura en el área CONTROL de la prueba para muestras negativas y positivas (sirve como medida de control IgG interno y confirma la ejecución correcta de la prueba). Una línea rosa/púrpura en las áreas TEST y CONTROL indica un resultado positivo.

PROCEDIMIENTOS DE LA PRUEBA

- Si la muestra está refrigerada, sacarla del refrigerador y dejarla que adquiera temperatura ambiente antes de proceder al análisis de la misma.
- Sacar las pruebas necesarias de CHAGAS STAT-PAK™ de su bolsa abriéndola siguiendo la marca de corte y ponerlas sobre una superficie plana.
- Etiquetar la prueba con el nombre del paciente o el número de identificación.
- Para extraer sangre total a través de una punción digital, pinchar el dedo y limpiar la primera gota de sangre. Recoger la segunda gota en un tubo Microsafe® sosteniéndolo en posición horizontal tal como aparece en el dibujo más abajo. Hacer tocar la punta del tubo con la muestra de

sangre. La acción capilar hará que la muestra sea absorbida por la línea negra de llenado y detenerse.



Never squeeze the bulb of the tube while sampling.

Nunca apretar la perilla del tubo a la hora de recoger la muestra

- Añadir el espécimen al centro del pozo SAMPLE



To push the sample out of the Microsafe® Tube, line up the tip of the tube with the SAMPLE well and squeeze the bulb.

Para extraer la muestra del tubo microsafety®, alinear la punta del tubo con el pozo SAMPLE y apretar la perilla. ÚNICAMENTE SI LA MUESTRA NO SALE DEL TUBO, sostener el tubo verticalmente y deslizar un dedo por encima del agujero de ventilación cerca de la marca negra. Alinear entonces la punta con el pozo SAMPLE y apretar la perilla.



- Poner la botella de disolvente boca abajo y sostenerla en posición vertical (no formando un ángulo) encima del pozo SAMPLE. Añadir 6 gotas (~240 µl) de disolvente muy despacio: en el pozo SAMPLE.



- Leer los resultados a los 15 minutos de haber añadido el disolvente. Esperar 15 minutos completos para confirmar que un resultado es realmente negativo. *No leer ningún resultado después de 15 minutos.*

NOTA: El volumen de la muestra es decisivo, utilizar una pipeta con precisión. Si se añaden más de 10 µl de sangre total la sensibilidad disminuirá.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Resultado Negativo:



Una línea rosa/púrpura en el área CONTROL con ninguna línea visible en el área TEST indica un resultado negativo. Un resultado negativo a los 15 minutos indica que no se han detectado anticuerpos anti Chagas en la muestra. Un resultado negativo no descarta la posibilidad de que el paciente pueda padecer Chagas.

Resultado Positivo

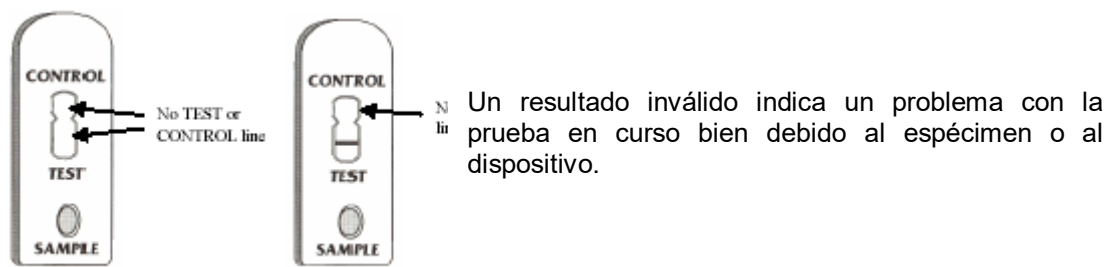


Dos líneas rosa/púrpura en el área TEST y en el área CONTROL indican un resultado positivo. La línea en el área TEST puede parecer distinta a la línea en el área CONTROL.

NOTA: Las intensidades de las líneas en las áreas TEST y CONTROL puede variar. Si cualquier línea visible aparece en el área TEST y en el área CONTROL, el resultado es positivo.

Resultado inválido

Una línea rosa/púrpura siempre debe aparecer en el área CONTROL independientemente de si en el área TEST aparece una línea o no. Si no se distingue ninguna línea rosa/púrpura en el área CONTROL, la prueba no es válida y debe volver a repetirse utilizando una nueva prueba (dispositivo).



CONTROL DE CALIDAD

Una línea rosa/púrpura debe aparecer siempre en el área CONTROL si la prueba se ha realizado correctamente y el dispositivo funciona adecuadamente. Sirve como medida de control interno. Un fondo claro en el área TEST es un mecanismo de control interno negativo.

Una Buena Práctica de Laboratorio recomienda el uso de materiales de control junto con las muestras para asegurar una correcta ejecución del kit. Controles de suero o plasma negativos y positivos deben utilizarse con este fin. Utilizar controles siguiendo las instrucciones para proceder a la prueba que vienen en el Kit.

RESULTADOS ESPERADOS

Ésta es una prueba cualitativa para detectar anticuerpos contra T. Cruzi en sangre, suero, o plasma. La presencia de anticuerpos sugiere una infección por T. cruzi y el resultado esperado será positivo. En ausencia de infección, se observará un resultado negativo. Esto se basa en los hallazgos con la prueba CHAGAS STAT-PAK™.

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

El procedimiento CHAGAS STAT-PAK™ y la interpretación de los resultados debe ser objeto de un estrecho seguimiento. El ensayo ha sido diseñado para detectar anticuerpos anti T. cruzi en suero humano, plasma o sangre total. No deben utilizarse los resultados del análisis de otros fluidos corporales. Para muestras positivas se recomienda que se realice una prueba de referencia más concreta, junto con una evaluación clínica de la situación del paciente antes de

hacer un diagnóstico definitivo. No deben utilizarse sólo pruebas rápidas para diagnosticar la infección por T. cruzi aunque se hayan detectado anticuerpos contra T. cruzi. Un resultado no descarta la posibilidad de una infección por T. cruzi. Pruebas de seguimiento adicionales utilizando otros métodos clínicamente disponibles se requieren si el resultado con CHAGAS STAT-PAK™ de Chembio es negativo y los síntomas clínicos persisten o no se adecuan a otros datos clínicos disponibles.

INTERFERENCIA Y REACTIVIDAD CRUZADA

La ejecución de la prueba fue evaluada utilizando varios sueros que contienen diferentes títulos de anticuerpos de Chagas y muestras que contienen varias sustancias que han interferido. No se obtuvo ninguna interferencia de bilirrubina, hemoglobina ni triglicéridos con la prueba CHAGAS STAT-PAK™ de Chembio. Niveles de factor reumatoide de hasta 80 IU/ml no interfieren con la prueba, niveles más elevados pueden resultar en positivos falsos. No se observó ninguna reactividad cruzada de sueros infectados con Leishmaniasis mediante el ensayo CHAGAS STATPAK™ de Chembio.

2. TEST INMUNOCROMATOGRÁFICO RÁPIDO INBIOS™ (InBIOS Internacional, Inc.)



Prueba Rápida para la Detección de Trypanosoma™

**Para la detección de anticuerpos de T. cruzi en Suero infectado o
Sangre Entera**

Uso Previsto

La prueba rápida para la detección diagnóstica de infección de T. cruzi en seres humanos es una tira inmunocromatográfica rápida basada en un antígeno recombinante con multi-epitopes. Las pruebas rápidas son utilizadas para la detección cualitativa de anticuerpos presentes en el suero derivados de antígenos de T. cruzi. Este ensayo sólo es para el uso de diagnóstico in vitro.

PARA EL USO DE INVESTIGACIÓN SOLAMENTE.

Resumen y explicación

La enfermedad de Chagas es causada por un protozoo flagelado, el Trypanosoma cruzi y es

infección endémica de mucha importancia en América Central y del Sur que afecta a 16 a 18 millones individuos (1). Durante los años pasados, campañas intensivas de la erradicación dirigidas contra el triatomino, han disminuido drásticamente la transmisión por el vector especialmente en áreas rurales, y no existe hoy en muchas regiones donde solía ser endémica. Sin embargo, la transfusión de sangre contaminada con el parásito continúa siendo una forma importante de la transmisión (2, 4).

La migración y la inmigración de la gente condujeron a la extensión de la enfermedad más allá de las fronteras geográficas de América latina, y ha sido detectado en Europa, Asia, y los Estados Unidos. Debido a esto la transmisión transfusional de la enfermedad de Chagas es predominante por lo que en la actualidad se realiza una investigación sistemática de la sangre de los donantes no solamente en América Latina, sino también en los países desarrollados que reciben inmigrantes de áreas endémicas (1, 5).

Varias estrategias existen para la diagnosis de la Enfermedad de Chagas, como: la Detección directa del parásito en la sangre por microscopia, el Hemocultivo, el Xenodiagnóstico, o la PCR que es altamente específica y confirma la existencia de una infección (4, 5).

Sin embargo, estos procedimientos son técnica y operacionalmente exigentes. Otras pruebas corrientemente usadas son: La fijación de complemento, hemoaglutinación indirecta y anticuerpos fluorescentes (IFA). Todos carecen de especificidad y/o sensibilidad (6, 9).

Pruebas serológicas que detectan los anticuerpos específicos para los antígenos expresados por el diferente las etapas de desarrollo del parásito son bien utilizados para una diagnosis rápida y fácil de la enfermedad (10, 14). En una tentativa para mejorar el diagnóstico serológico de la enfermedad de Chagas, hemos identificado y usado un antígeno recombinante Multi-epitope derivado de diversos antígenos de *T. cruzi* (15, 18). Este antígeno está integrado por un total de nueve diferentes epitopes (15, 16).

Principio

Esta prueba inmunocromatográfica está diseñada para la determinación cualitativa de los anticuerpos de *T. cruzi* presente en el suero frente a los antígenos de *T. cruzi*. Esta prueba detecta los anticuerpos anti-*T. cruzi* de individuos infectados.

La prueba se basa en una mezcla de oro que contiene la conjugación del blanco y su capacidad de capturar a los anticuerpos presente en suero y sangre entera. Una vez que llega al límite, el complejo antígeno-anticuerpo debe moverse lateralmente para formar un complejo con proteínas derivadas inmovilizadas del *T. cruzi* presentes en la membrana formando una línea. El oro desatado continuará moviéndose hacia arriba para dar lugar a la formación de una línea control.

La prueba es positiva cuando se observa la aparición de dos líneas (referir al cuadro 1).

Precauciones

- No utilizar después de fecha de vencimiento.
- Manejar todos los sueros, sangre entera y kits usados como si estos contuvieran agentes infecciosos. Observar las precauciones establecidas contra peligros microbiológicos mientras esté realizando todos los procedimientos y siga los procedimientos estándares para el apropiado desecho del suero/sangre entera y kits usados.
- Use ropa protectora de descarte, protección ocular y guantes desechables mientras que realiza el análisis. Lavado de manos a fondo cuando haya acabado.
- Evitar todo el contacto entre las manos y ojos o membranas mucosas durante la realización de la prueba

- No comer, no beber ni fumar dentro área destinada al manejo de los sueros y los kits.
- El buffer contiene un preservante, por lo que se recomienda evitar contacto con la piel, boca y membranas mucosas.

Almacenamiento

El jalador del empaque del frasco contenedor de las prueba en tira, está diseñado para ser almacenada a temperatura ambiente (20°C-28°C) en una bolsa o frasco sellada para la duración de su vida útil. El frasco del buffer está diseñado para ser almacenado a temperatura ambiente para la duración de su vida útil. La exposición a temperaturas encima de los 30°C puede afectar el funcionamiento de la prueba y debe ser reducido al mínimo. Las tiras no deben ser congeladas. La prueba debe ser utilizada rápidamente (tan rápidamente como sea posible preferiblemente en el plazo de 2-5 minutos) después del retiro de la bolsa o frasco para prevenir la exposición a la humedad. No almacenar las pruebas expuestas a luz del sol (almacén en cortina o lugares oscuros para prevenir el aumento de la temperatura dentro de las bolsas).

Colección de la Muestra

- La sangre de entera o suero debe ser probadas con esta tira. Para la recolección de sangre entera
Se podrá usar K2, o K3 ÉDTA, o bien muestras de la sangre heparinizada.
- Quitar el suero del coágulo de células rojas para evitar cuanto antes la hemólisis.
- La prueba se debe realizar tan pronto como sea posible después de la recolección de la muestra. No dejar las muestras a temperatura ambiente por períodos prolongados. Los sueros pueden ser refrigerado en 2-8°C hasta 3 días. Caso contrario deben ser almacenados en el congelador.
- Llevar la sangre entera o suero a temperatura ambiente antes de la realización de la prueba.
- La congelación de los sueros se debe ser total antes de la realización de la prueba. Los sueros no deben ser sometidos a congelamientos y descongelamientos repetidos.
- Si se va la sangre de entera o suero deben ser enviadas, deben ser embalados en conformidad a las regulaciones federales de transporte de agentes infecciosos.

Contenido del Kit

1. Cincuenta (50) tacos de prueba individualmente embalados. Almacenamiento a temperatura ambiente.
2. Un (1) frasco de Solución de Oro de 3 ml. Almacenamiento a temperatura ambiente.

3. Un (1) frasco de solución tampón Tipo A de 6 ml. Almacenamiento a temperatura ambiente.
4. Cincuenta pipetas de transferencia.

Método de Prueba



1. Quitar el taco o cassette del empaque plástico.
2. Coloque el taco sobre una superficie plana. Identifique el taco utilizando un marcador indeleble en la parte destinada a la identificación y marcada con ID situada en la parte media del taco.

3. Agregar 5 ul del suero humano o de sangre entera a orificio destinado a la muestra. Se recomienda el uso de la pipeta de transferencia que está provista en el kit.
4. Agregar suavemente 1 gota (40 ul) de la solución de oro, provista en el kit, en el orificio de muestra. Es importante la adición de una sola gota.



5. Esperar 5 minutos (+/- 30 segundos).



5 minutos

6. Adicionar 1 gota (40 ul) de la solución tampón Tipo A en el orificio de muestra.



7. Leer los resultados en los 15 minutos adicionales. (20 minutos es el tiempo total del ensayo). No interprete los resultados fuera del tiempo determinado.

Interpretación de resultados

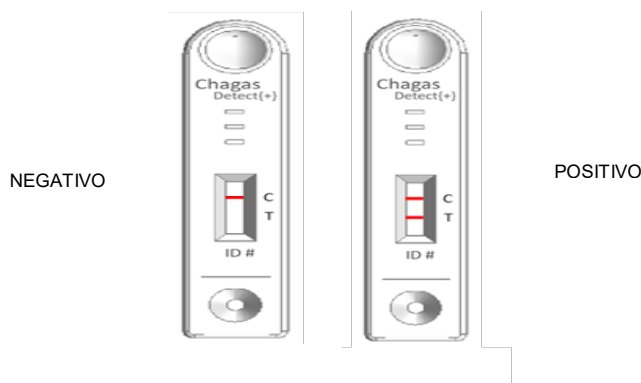
Resultado Positivo

La prueba es positiva cuando una línea del control y la línea de la prueba aparecen en la zona de prueba según lo demostrado en el cuadro 1. Una línea débil se considera un resultado positivo. Como guía para la interpretación, el color rojo en la región de la prueba variará dependiendo de la concentración de anticuerpos contra *T. cruzi* presentes. La línea de la prueba para las muestras "débil positivas" puede demostrar un positivo débil pero la línea roja distinta. (las muestras "débil positivas" son éstas con los anticuerpos bajos de la afinidad.)

Nota: La línea del control es azul débil antes del ensayo y vira a rojo después de la migración del oro.

Resultado Negativo

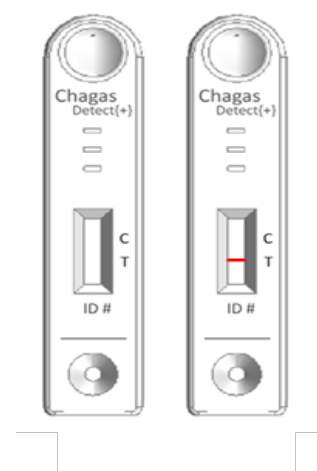
La prueba es negativa cuando solamente aparece la línea del control. No hay línea de la prueba presente como en el cuadro 2



Resultado Inválido

Ningunas líneas aparecen en el control o la línea áreas de la prueba. La prueba es también inválida si no aparece ninguna línea del control, pero se considera una línea de la prueba. Se recomienda para reexaminar con una nueva tira de prueba y un suero humano fresco.

Nota: El color rojo en la región de la prueba variará dependiendo de la concentración de los anticuerpos específicos presentes en *T. anfitriones* infectados cruzi. Sin embargo, ni el valor cuantitativo ni el coeficiente de incremento en anticuerpos se puede determinar por esta prueba cualitativa.



Limitaciones

- Para su uso en investigación solamente
- Esta prueba indicará solamente la presencia de anticuerpos a nuestro antígeno recombinante en suero o sangre entera de humanos y no debe ser utilizado como el criterio único para el diagnóstico de infección por T. cruzi.

Nota: Como con todas las pruebas de diagnóstico, todos los resultados se deben considerar la otra información disponible para los médicos.

- Si el resultado es negativo y persisten los síntomas clínicos, para el seguimiento adicional se recomienda usar otros métodos clínicos. Un resultado negativo no imposibilita la posibilidad de infección por T. cruzi.
- No utilizar las muestras del suero o de la sangre entera que contienen ningún glicerol u otros materiales viscosos. Esto comprometerá la sensibilidad del análisis dramáticamente.
- No utilizar muestras envejecidas y hemolizadas. Muestras altamente hemolizadas interferirán con funcionamiento de la prueba.

3. ENSAYO INMUNOENZIMÁTICO ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*). 2ª GENERACIÓN (CONVENCIONAL) – Wiener

PRINCIPIO DE LA PRUEBA

El ensayo Wiener Chagas-ELISA™ 2ª generación (convencional) es un diagnóstico serológico de la enfermedad de Chagas. Esta técnica se basa en la adsorción pasiva del antígeno soluble de *T. cruzi* en un soporte o fase sólida (superficie de poliestireno) constituido por los pocillos de las placas de microtitulación. Este antígeno es puesto en contacto con los anticuerpos presentes en el suero de los enfermos chagásicos, en dilución apropiada y los complejos antígeno-anticuerpo formados son detectados mediante un suero antigammaglobulina humana marcado con una enzima (conjugado) cuya presencia es a su vez revelada, aún en concentraciones mínimas, gracias a un sustrato específico para la enzima y una sustancia cromógena, que es normalmente incolora pero que en contacto con la sustancia producida por la reacción enzimática tiene la capacidad de colorearse. La intensidad del color es directamente proporcional a la cantidad de conjugado ligado al complejo antígeno-anticuerpo y en consecuencia a la concentración de anticuerpos presentes en la muestra. (Torrico F., Castro M., 2002)

La sensibilidad del método es del 100 % y la especificidad del 99.6 %. (Wiener Lab., 2000)

Material necesario para la punción venosa: (la prueba debe realizarse utilizando suero)

- Guantes no estériles
- Torniquete
- Tubos de cristal estériles de 5ml sin anticoagulante
- Jeringuilla estéril y aguja (5ml)

Material proporcionado para la prueba (KIT ELISA 2ª generación o convencional):

- Placa microtitulada sensibilizada: Con antígenos inmovilizados citoplásmicos y membrana del *T. cruzi*
- Conjugado : Anti-inmunoglobulina humana (cabra) con peróxidos
- Desarrollador A: Peróxido de hidrógeno a 60 mmol/l en una solución tampón de citrato de 50 mmol/l pH 3,2
- Desarrollador B: Tetrametilbencidina (TMB) a 0,01 mol/l en una solución de ácido hidroclicórico al 0,1 N
- Solución de parada: Ácido sulfúrico a 2N
- Solución tampón (concentrada): Cloro sódico a 1,4 mol/l en una solución tampón de fosfato a 100mmol/l y solución de tensión no iónica activa a 0,1 g/l
- Diluyentes concentrados por muestra: Albúmina bovina en una solución fisiológica (solución tampón de fosfato con un pH de 7,2)
- Control positivo : dilución de suero inactivado que contiene anticuerpos contra *T. cruzi*
- Control negativo: dilución de suero inactivado no reactivo para *T. cruzi*

Materiales requeridos pero no proporcionados en el kit ELISA convencional

- Micropipeta automática de 10µl - 100µl
- Punta de plástico para micropipeta de 10µl-100µl (amarilla)
- Micropipeta automática de 100µl – 1000µl
- Punta de plástico para micropipeta de 100µl-1000µl (azul)
- Micropipeta multicanales de 20µl – 200µl
- Punta de plástico para pipeta multicanales de 10µl-100µl (multicanal amarillo)
- Temporizador
- Incubadora (37° C).
- Lector para ELISA
- Temporizador
- Guantes no estériles

CONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD

El kit debe conservarse en cadena de frío.

Todos los reactivos: estables en cadena de frío (2-10°C) hasta la fecha de caducidad

Estable sólo 3 meses a temperatura ambiente.

NOTA: No utilizar kits caducados. – NO CONGELAR LOS KITS

PRECAUCIONES

La prueba es SÓLO PARA USO DIAGNÓSTICO IN VITRO. SÓLO para USO PROFESIONAL. Utilizar la prueba de acuerdo con las instrucciones suministradas con el kit.

Manejar los especímenes tal como se recomienda para suero humano infeccioso o espécimen de sangre en el manual CDC-NIH, Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, 4^a ed., 1999.

Utilizar vestimenta protectora adecuada (guantes, bata de laboratorio, guantes de seguridad) cuando se manejan las muestras. Evitar el contacto con manos, ojos o boca durante la recogida de especímenes y el análisis.

No utilizar la pipeta o absorber ningún material utilizando la boca. No fumar, comer ni beber en las zonas donde se guardan los especímenes o el material.

Tras completar el ensayo, esterilizar usando un autoclave todos los materiales durante 1 hora a 125°C. Alternativamente, los materiales pueden tratarse con una solución de lejía al 10%. Eliminar el material con cuidado en bolsas biopeligrosas. No mezclar reactivos de diferentes lotes de kits.

RECOGIDA DE ESPECÍMENES – Venopunción

Material necesario:

- Torniquete
- Desinfectante
- Guantes
- Aguja (tamaño adaptado al paciente) y una jeringuilla de 5ml
- Algodón
- Tubo para sangre estéril sin anticoagulante (5ml)

Procedimiento:

Antes de empezar lavarse las manos y ponerse guantes desechables. Los guantes siempre deben llevarse a modo de protección. Explicar siempre al paciente lo que se le va a hacer y por qué.

Punto de acceso

Tomar el tiempo necesario hasta encontrar una vena de tamaño razonable. La vena media cubital en la fosa antecubital es la que se suele utilizar con más frecuencia, aunque también pueden utilizarse otras venas en el antebrazo o la mano.

Utilizar un torniquete de 5-10 cm y colocarlo por encima del punto de acceso a la vena seleccionada.

Golpeando con cuidado una pequeña vena o frotando por encima de la misma con alcohol, comprobar si se dilata.

Muestra de sangre:

1. Limpiar la piel con un desinfectante.
2. Utilizando la mano dominante, sostener la jeringuilla con la aguja e insertar la aguja a través de la piel en la vena con un ángulo de 15-30 grados. Si se ha conseguido entrar en la vena, por la parte correspondiente a la punta de la aguja saldrá sangre.
3. Apoyar la aguja y la jeringuilla con la otra mano, liberando la mano dominante para extraer la sangre con la jeringuilla. Se necesita práctica para que esto resulte fácil y evitar que la aguja se salga de la vena cuando se cambian las manos de posición.
4. Cuando hay suficiente sangre en la jeringuilla sacar la aguja y la jeringuilla de la vena con rapidez y presionar la zona de la vena pinchada con algodón.
5. Bastará con presionar durante dos a tres minutos.

6. Transferir la sangre a los tubos adecuados con cuidado. Invertir los tubos varias veces para asegurar que se mezcla bien su contenido (esto es especialmente importante para muestras destinadas a examinar la coagulación).
7. No intentar volver a tapar la aguja, tirarla inmediatamente junto a la jeringuilla contaminada al contenedor de cortopunzantes.

Extracción de suero:

1. Centrifugar el tubo de sangre 3000rpm durante 10 min (mínimo)
2. Abrir el tubo y recoger el sobrenadante (suero), utilizando una pipeta de transferencia estéril.
3. Transferir el suero a l tubo o varios tubos Eppendorf®
4. Las muestras de los pacientes pueden trabajarse mejor cuando se analizan inmediatamente después de su extracción.
5. De no ser así, la conservación debe ser la siguiente:
6. La muestra puede conservarse en cadena de frío (2°C-8°C) hasta 1 semana.
7. Para una conservación más larga, la muestra debe congelarse a menos 20°C (-20°C) por lo menos.

ELISA 2º convencional – PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA:

- Permitir que el reactivo y la muestra adquieran temperatura ambiente antes de proceder al análisis.
- Preparar el disolvente de la muestra añadiendo 1 medida de disolvente concentrado por 4 medidas de agua destilada
- Preparar la placa microtitulada (identificar los pozos)

Nota: Par cada placa microtitulada utilizada, reservar

- ✓ 1 pozo para blancos
- ✓ 2 pozos para control positivo
- ✓ 3 pozos para control negativo

- Añadir 200 µL de disolvente en todos los pozos
- Añadir 10 µl de control positivo en los pozos correspondientes
- Añadir 10 µl de control negativo en los pozos correspondientes.
- Añadir 10µl de suero fisiológico en el correspondiente pozo
- Añadir 10 µL de muestra (suero) en el pozo correspondiente
- Homogeneizar la muestra y los disolventes en cada pozo
- Con cuidado agitar la placa microtitulada durante 10 segundos (la placa debe permanecer en posición horizontal)
- Cubrir la placa para evitar la evaporación
- Incubar durante 30 minutos a 37°C
- Aspirar el sobrenadante de cada pozo
- Lavar 5 veces cada pozo utilizando la solución tampón para lavado.
- Tras el último lavado, eliminar el exceso de sobrenadante poniendo la placa microtitulada boca abajo sobre un papel absorbente.
- Añadir 1 gota de conjugado en cada pozo (50µl si se utiliza una micropipeta automática)
- Cubrir la placa microtitulada
- Incubar durante 30 min a 37°C
- Aspirar el sobrenadante de cada pozo
- Lavar 5 veces cada pozo utilizando la solución tampón para lavado
- Tras el último lavado, eliminar el exceso de sobrenadante poniendo la placa microtitulada boca abajo sobre una papel absorbente
- Añadir una gota (50µl) de Desarrollador A en cada pozo
- Añadir 1 gota (50µl) de Desarrollador B a cada pozo
- Incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente en un lugar oscuro
- Añadir 1 gota (50µl) de solución de detención
- Leer la absorción utilizando un espectrofotómetro de onda larga 450/630 nm durante 30 minutos (limitar el campo de estabilidad de la reacción)

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

La presencia o ausencia de anticuerpos anti-T. cruzi viene determinada por el valor de la absorción y respectivamente por el valor de corte calculado.

Cálculo del valor de corte (siguiendo las recomendaciones del fabricante) para ELISA-convencional® Wiener

Cálculo de la suma de la absorción de todos los controles negativos ($\sum CN = CN1 + CN2 + CN3$)

Sumar el valor a un factor constante = 0,200

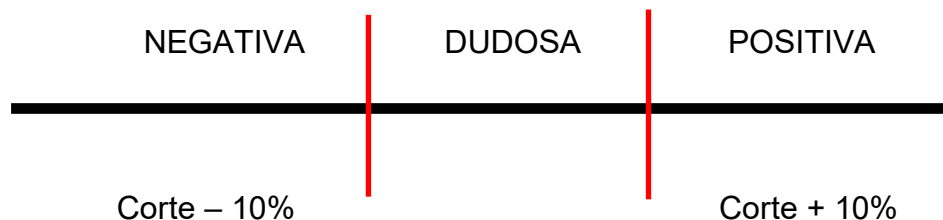
$$\text{Cut -Off} = \sum CN + 0.200 \text{ D.O}^*$$

*DO = Desviación óptica

MUESTRA POSITIVA: Todas las muestras con una DO por encima del valor (corte + 10%)

MUESTRA NEGATIVA: Todas las muestras con una DO por debajo del valor (corte - 10%)

MUESTRA DUDOSA: Todas las muestras con una DO entre (corte - 10%) < DO < (corte + 10%)



CONTROL DE CALIDAD

Se realizan controles positivos y negativos para cada serie de pruebas (cada vez utilizamos una nueva placa microtitulada).

RESULTADOS ESPERADOS

Ésta es una prueba cualitativa para la detección de anticuerpos anti T. Cruzi en sangre (suero o plasma). La presencia de anticuerpos indica una infección por T. cruzi y el resultado esperado será positivo. En ausencia de infección, se observará un resultado negativo.

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

El procedimiento CHAGAS ELISA convencional y la interpretación de los resultados debe ser objeto de un estrecho seguimiento. El ensayo ha sido diseñado para detectar anticuerpos anti T. cruzi en suero humano o plasma. No debe utilizarse el resultado del análisis de otros fluidos corporales.

INTERFERENCIA Y REACTIVIDAD CRUZADA

La ejecución de la prueba fue evaluada utilizando varios sueros que contenían diferentes títulos de anticuerpos de Chagas y las muestras contenían varias sustancias que interferían. Se han observado reacciones cruzadas en pacientes infectados con Leishmaniasis, malaria o Tuberculosis

4. INMUNO-ENSAYO (ELISA) 3ª GENERACIÓN (Recombinante 3.0) - Wiener

PRINCIPIO DE LA PRUEBA

El ensayo Wiener Chagas-ELISA™ 3ª generación (recombinante 3.0) es un diagnóstico serológico de la enfermedad de Chagas. Esta técnica se basa en la absorción pasiva del antígeno recombinante del T. cruzi en un dispositivo de soporte consistente en una placa microtitulada llena de pozos (placas ELISA). Los antígenos se elaboran a partir de un DNA recombinante de proteínas específicas del T. cruzi en la fase epimastigota y tripomastigota.

La muestra se diluye en un dispositivo soporte en el que hay antígenos específicos inmovilizados. Si la muestra contiene los anticuerpos específicos, éstos forman un complejo con los antígenos del dispositivo de apoyo y permanecerán unidos al soporte.

Material necesario para la punción venosa: (para poder realizar la prueba utilizando suero)

- Guantes no estériles
- Torniquete
- Tubos de cristal estériles de 5ml sin anticoagulante
- Jeringuilla estéril con aguja (5ml)

Material proporcionado para la prueba (KIT ELISA 3ª generación o recombinante 3.0 - Wiener):

- Placa microtitulada sensibilizada: antígeno recombinante inmovilizado del T. cruzi
- Conjugado: anti-inmunoglobulina humana (cabra) con peroxidasa
- Desarrollador A: Peróxido de hidrógeno 60 mmol/l en una solución de citrato a 50 mmol/l pH 3.2
- Desarrollador B: tetrametilbencidina (TMB) a 0,01 mol/l en una solución de ácido hidrocórico a 0,1 N
- Solución de parada: Ácido sulfúrico a 2N

- Solución tampón para lavado (concentrada): Cloro sódico a 1,4 mol/l en una solución tampón de fosfato a 100mmol/l y una solución activa de tensión no iónica a 0,1 g/l
- Disolvente concentrado para muestra: Albúmina bovina en una solución fisiológica (solución tampón de fosfato con un pH de 7,2)
- Control positivo : dilución de suero inactivado que contiene anticuerpos al T. cruzi
- Control negativo: dilución de suero inactivado no reactivo para T. cruzi

Materiales requeridos pero no proporcionados en el kit ELISA recombinante

- Micropipeta automática de 10µl - 100µl
- Punta de plástico para micropipeta de 10µl-100µl (amarilla)
- Micropipeta automática de 100µl – 1000µl
- Punta de plástico para micropipeta de 100µl-1000µl (azul)
- Micropipeta multicanales de 20µl – 200µl
- Punta de plástico para pipeta multicanales de 10µl-100µl (amarillo)
- Temporizador
- Incubadora (37° C).
- Lector para ELISA
- Temporizador
- Guantes no estériles

CONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD

El kit debe conservarse en cadena de frío.

Todos los reactivos: estables en cadena de frío (2-10°C) hasta la fecha de caducidad

Estable únicamente durante 3 meses a temperatura ambiente.

NOTA: No utilizar kits caducados. – NO CONGELAR LOS KITS

PRECAUCIONES

La prueba es SÓLO PARA USO DIAGNÓSTICO IN VITRO. SÓLO para USO PROFESIONAL. Utilizar la prueba de acuerdo con las instrucciones suministradas con el kit.

Manejar los especímenes tal como se recomienda para suero humano infeccioso o espécimen de sangre en el manual CDC-NIH, Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, 4ª ed., 1999.

Utilizar vestimenta protectora adecuada (guantes, bata de laboratorio, guantes de seguridad) cuando se manejan las muestras. Evitar el contacto con manos, ojos o boca durante la recogida de especímenes y el análisis.

No utilizar la pipeta o absorber ningún material utilizando la boca. No fumar, comer ni beber en las zonas donde se guardan los especímenes o el material.

Tras completar el ensayo, esterilizar usando un autoclave todos los materiales durante 1 hora a 125°C. Alternativamente, los materiales pueden tratarse con una solución de lejía al 10%. Eliminar el material con cuidado en bolsas biopeligrosas.

No mezclar reactivos de diferentes lotes de kits

RECOGIDA DE LA MUESTRA – punción venosa

Utilizar 1 alícuota de muestra de suero antes de proceder a realizar el análisis con ELISA-recombinante 3.0-Wiener®

PROCEDIMIENTO DE LA MUESTRA:

- Permitir que el reactivo y la muestra adquieran temperatura ambiente antes de proceder al análisis.
- Preparar el disolvente de la muestra añadiendo 1 medida de disolvente concentrado por 4 medidas de agua destilada
- Preparar la placa microtitulada (identificar los pozos)

Nota: Para cada placa microtitulada utilizada, reservar

1 pozo para blancos

3 pozos para control negativo

2 pozos para control positivo

2 pozos para controles de calidad interno

- Añadir 200 μ L de disolvente en todos los pozos
- Añadir 10 μ l de control positivo en los pozos correspondientes
- Añadir 10 μ l de control negativo en los pozos correspondientes.
- Añadir 10 μ l de suero fisiológico en el correspondiente pozo
- Añadir 10 μ L de muestra (suero) en el pozo correspondiente
- Homogeneizar la muestra y los disolventes en cada pozo
- Con cuidado agitar la placa microtitulada durante 10 segundos (la placa debe permanecer en posición horizontal)
- Cubrir la placa para evitar la evaporación
- Incubar durante 30 minutos a 37°C
- Aspirar el sobrenadante de cada pozo
- Lavar 5 veces cada pozo utilizando la solución tampón para lavado.
- Tras el último lavado, eliminar el exceso de sobrenadante poniendo la placa microtitulada boca abajo sobre un papel absorbente.
- Añadir 1 gota de conjugado en cada pozo (50 μ l si se utiliza una micropipeta automática)
- Cubrir la placa microtitulada
- Incubar durante 30 min a 37°C
- Aspirar el sobrenadante de cada pozo
- Lavar 5 veces cada pozo utilizando la solución tampón para lavado
- Tras el último lavado, eliminar el exceso de sobrenadante poniendo la placa microtitulada boca abajo sobre una papel absorbente
- Añadir una gota (50 μ l) de Desarrollador A en cada pozo
- Añadir 1 gota (50 μ l) de Desarrollador B a cada pozo
- Incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente en un lugar oscuro
- Añadir 1 gota (50 μ l) de solución de detención
- Leer la absorción utilizando un espectrofotómetro de onda larga 450/630 nm durante 30 minutos (limitar el campo de estabilidad de la reacción)

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

La presencia o ausencia de anticuerpos anti-*T. cruzi* viene determinada por el valor de la absorción y respectivamente por el valor de corte calculado.

Cálculo del valor de corte (siguiendo las recomendaciones del fabricante) para ELISA-convencional® Wiener

Cálculo de la suma de la absorción de todos los controles negativos ($\Sigma CN = CN1 + CN2 + CN3$)

Sumar el valor a un factor constante = 0,300

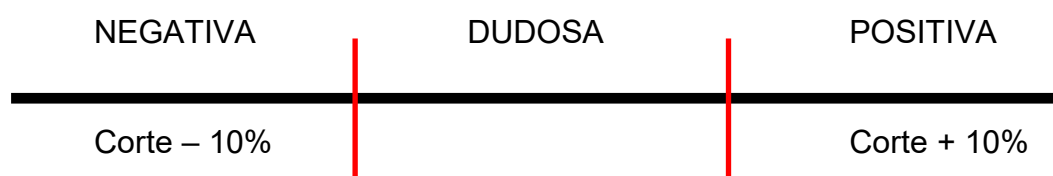
$$\text{Cut -Off} = \Sigma CN + 0.300 \text{ D.O}^*$$

*DO = Desviación óptica

MUESTRA POSITIVA =: Todas las muestras con una DO por encima del valor (corte + 10%)

MUESTRA NEGATIVA =: Todas las muestras con una DO por debajo del valor (corte - 10%)

MUESTRA DUDOSA =: Todas las muestras con una DO entre (corte - 10%) < DO < (corte + 10%)



CONTROL DE CALIDAD

Se realizan controles positivos y negativos para cada serie de pruebas (cada vez que utilizaremos una nueva placa microtitulada).

RESULTADOS ESPERADOS

Ésta es una prueba cualitativa para la detección de anticuerpos anti T. cruzi en sangre (suero o plasma). La presencia de anticuerpos indica una infección por T. cruzi y el resultado esperado será positivo. En ausencia de infección, se observará un resultado negativo.

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

El procedimiento CHAGAS ELISA convencional y la interpretación de los resultados debe ser objeto de un estrecho seguimiento. El ensayo ha sido diseñado para detectar anticuerpos anti T. cruzi en suero humano o plasma. No debe utilizarse el resultado del análisis de otros fluidos corporales.

INTERFERENCIA Y REACTIVIDAD CRUZADA

La ejecución de la prueba fue evaluada utilizando varios sueros que contenían diferentes títulos de anticuerpos de Chagas y las muestras contenían arias sustancias que interferían. Se han observado reacciones cruzadas en pacientes infectados con Leishmaniasis, malaria o Tuberculosis.

5. HEMOAGLUTINACIÓN INDIRECTA PARA CHAGAS (HAI®) - POLYCHACO®

PRINCIPIO DE LA PRUEBA

Esta es una técnica de diagnóstico indirecto que se basa en la detección de anticuerpos aglutinantes específicos anti *T. cruzi* presentes en los sueros de enfermos chagásicos, para ello, el antígeno soluble de *T. cruzi* es fijado a la superficie de glóbulos rojos, que previamente han sido tratados por un agente químico que asegura una unión sólida y estable entre las proteínas antigénicas y la superficie de los glóbulos rojos que se comportan como simples partículas inertes capaces de absorber antígenos parasitarios y que habiendo sido *sensibilizados* de esta manera, se aglutinan cuando son puestos en presencia de diferentes diluciones de los sueros estudiados y que contienen anticuerpos específicos anti *T. cruzi*.

Como en el suero tanto de individuos infectados como de los no infectados, pueden existir anticuerpos inespecíficos, especialmente anticuerpos heterófilos, estos deben investigarse, enfrentando el suero con glóbulos rojos no sensibilizados. Si se produce aglutinación de los glóbulos rojos no sensibilizados en presencia de los sueros, estos deben tratarse con Mercapto-etanol para eliminar los anticuerpos heterófilos.

La prueba debe hacerse únicamente utilizando muestras de suero

Esta técnica presenta una sensibilidad relativa, mayor en las formas crónicas que en las agudas (100 %), la especificidad relativa se considera buena (98 %), la exactitud relativa es del 100 %.

Material proporcionado para la prueba (KIT HAI- Polychaco®):

- Placa microtitulada con 96 pozos en forma de U
- Antígeno: glóbulos rojos de oveja sensibilizados con antígenos con *T. cruzi* (*reactivo 1*)
- Disolventes concentrados: solución salina con absorbentes y conservantes (*reactivo 2*)
- Solución proteínica: estabilizado con conservantes (*reactivo 3*)

- Glóbulos rojos de oveja estabilizados no sensibilizados (*reactivo 4*)
- Control positivo: Dilución de suero reactivo para *T. cruzi* (*reactivo 5*)
- Control Negativo: Dilución de suero no reactivo para *T. Cruzi* (*reactivo 6*)

Materiales requeridos pero no proporcionados en el HAI®-Polychaco™:

- Micropipeta automática de 10µl - 100µl
- Punta de plástica para micropipeta de 10µl-100µl (amarilla)
- Micropipeta automática de 100µl – 1000µl
- Punta de plástico para micropipeta de 100µl-1000µl (azul)
- Micropipeta multicanales de 20µl – 200µl
- Pipeta 1ml and 5ml
- Parafilm
- 2 Mercapto-etanol (para espécimen que muestra la reacción cruzada)
- Suero fisiológico (para preparación de la solución 2mercapto-etanol al 1%)
- Temporizador
- Incubadora (37° C).
- Espejo (para leer los resultados)
- Temporizador
- Guantes no estériles

CONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD

El kit debe conservarse en cadena de frío.

Todos los reactivos: estables en cadena de frío (2-8°C) hasta su fecha de caducidad.

PRECAUCIONES

La prueba es SÓLO PARA USO DIAGNÓSTICO IN VITRO. SÓLO para USO PROFESIONAL. Utilizar la prueba de acuerdo con las instrucciones suministradas con el kit.

Manejar los especímenes tal como se recomienda para suero humano infeccioso o espécimen de sangre en el manual CDC-NIH, Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, 4ª ed., 1999.

Utilizar vestimenta protectora adecuada (guantes, bata de laboratorio, guantes de seguridad) cuando se manejan las muestras. Evitar el contacto con manos, ojos o boca durante la recogida de especímenes y el análisis.

No utilizar la pipeta o absorber ningún material utilizando la boca. No fumar, comer ni beber en las zonas donde se guardan los especímenes o el material.

Tras completar el ensayo, esterilizar usando un autoclave todos los materiales durante 1 hora a 125°C. Alternativamente, los materiales pueden tratarse con una solución de lejía al 10%. Eliminar el material con cuidado en bolsas biopeligrosas.

No mezclar reactivos de diferentes lotes de kits.

RECOGIDA DE LA MUESTRA

Utilizar 1 alícuota de muestra de suero antes de proceder a realizar el análisis serológico

PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA:

- Permitir que el reactivo y la muestra adquieran temperatura ambiente antes de proceder al análisis.
- Preparar la solución disolvente, utilizando 0,5ml de solución proteínica (reactivo 3) para cada 10 ml de disolvente concentrado (reactivo 2).
- Preparar la placa microtitulada (identificar pozos)

	DILUCIÓN	TITULO	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1/8	8	Control (+)	Control (-)	Suero 1	Suero 2	Suero 3	Suero 4	Suero 5	Suero 6	Suero 7	Suero 8	Suero 9	Suero 10
B	1/16	16												
C	1/32	32												
D	1/64	64												
E	1/128	128												
F	1/256	256												
G	1/512	512												
H	1/1024	1024												

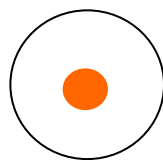
Nota: Para cada placa microtitulada utilizada reservar

1ª columna para control positivo

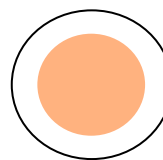
2ª columna para control negativo

- Añadir 70 µl de disolvente preparado a la fila 1
- Añadir 25 µl de disolvente preparado al resto de los pozos
- Añadir 10 µl de control positivo en el pozo A1
- Añadir 10 µl de control negativo en el pozo B1.
- Añadir 10µl de suero en los pozos C1, D1 hasta L1 (si el número de la muestra se requiere para llenar toda la línea nº 1)
- Homogeneizar la mezcla en el primer pozo y transferir 25 µl de pozo a pozo por toda la columna hasta llegar a la dilución 1/1024 (línea nº 8)
- Añadir glóbulos rojos no sensibilizados (reactivo 4) en todos los pozos de la línea 1 (dilución 1/8).
- Añadir 25 µl del antígeno (glóbulos rojos sensibilizados – reactivo 1) en los demás pozos (de la línea 2 a la 8).
- Agitar la placa microtitulada con cuidado y siempre en posición horizontal durante 30 segundos.
- Cubrir la placa microtitulada con parafilm nuevo (para evitar la evaporación y la contaminación)
- Incubar durante 2 horas como mínimo
- Leer los resultados, utilizando el espejo proporcionado para ello.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS



No reactivo



Reactivo

Resultados POSITIVOS = Reactividad para la dilución $\geq 1/16$ (*Titulación 16*)

REACTIVIDAD CRUZADA:

Si aparece una reacción positiva en la línea 1 (correspondiente a la dilución 1/8) → el suero analizado contiene antígenos “heterófilos” que crean una reacción cruzada (reacción positiva falsa).

En este caso, le muestra debe tratarse con una solución de 2.mercapto-etanol al 1% y todo el procedimiento HAI deberá repetirse.

Tratamiento con -2 Mercapto-etanol:

Preparar una solución de 2.mercapto-etanol al 1% (1ml de 2.mercapto-etanol con 99ml de suero fisiológico)

Añadir 25µl de 2.mercapto-etanol al 1% con 25µl de suero al tubo

Cerrar el tubo con parafilm

Incubar durante 30 minutos a 37°C o 120 minutos a temperatura ambiente (20°C-25°C)

Verificar que no hay agente gelatinoso en el tubo (el agente gelatinoso puede deberse a una muestra hiperlipidémica). Si aparece, repetir el tratamiento de la muestra utilizando una dilución 1/2 de suero.

Proceder al HAI tal como se ha descrito anteriormente, teniendo en cuenta que la primera línea contendrá muestra ya diluida en 1/4 (o 1/8 si la muestra ha sido tratada dos veces con 2.mercapto-etanol)

Leer los resultados de acuerdo con la recomendación indicada más arriba.

CONTROL DE CALIDAD

Se realizan controles positivos y negativos para cada serie de pruebas (cada vez utilizaremos una nueva placa microtitulada).

RESULTADOS ESPERADOS

Ésta es una prueba cualitativa para detectar anticuerpos anti *T. cruzi* en sangre (suero o plasma). La presencia de anticuerpos indica infección por *T. cruzi* y los resultados esperados serán positivos. En ausencia de infección, se observará un resultado negativo.

ANEXO 9

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Municipio: _____ Red de Salud: _____

Establecimiento de Salud: _____ Fecha: ___ / ___ / ___

Sr(s). Padre(s) de Familia:

El Programa Departamental de Chagas y el Laboratorio Departamental de Referencia, solicita su autorización para tomar una muestra de sangre digital y venosa de usted y/o cada uno de sus hijos de 1 a 17 años, con el objeto de realizar el diagnóstico de la enfermedad de Chagas y participar del estudio de investigación en Pruebas Rápidas para Chagas.

Si resultara POSITIVO el resultado del Diagnóstico, se le podrá ofrecer el tratamiento específico para dicha enfermedad.

Yo,.....,

doy mi autorización para tomar la muestra a mi persona y/o a mi(s) hijos(as):

- | | |
|---------|---------|
| 1. | 3. |
| 2. | 4. |

Firma o Huella: _____